Über die Herstellung von Nicotinylaminosäureestern, Ribosyl-Derivaten bzw. benzoylierten Nucleosid-Derivaten (NAD-Komponenten) sowie eines entsprechenden NAD-Analogen und ihre Wirkung auf Stoffwechselhemmung bei Insekten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Harry Pehlmann
aus Berlin

1975

Über die Herstellung von Nicotinylaminosäureestern, Ribosyl-Derivaten bzw. benzoylierten Nucleosid-Derivaten (NAD-Komponenten) sowie eines entsprechenden NAD-Analogen und ihre Wirkung auf Stoffwechselhemmung bei Insekten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Harry Pehlmann
aus Berlin

1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Professor Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider

2. Referent: Prof. Dr. H. Gnichtel

Tag der mündl. Prüfung: 6.5.1975

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider

am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin angefertigt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider, an dieser Stelle für das der Arbeit entgegengebrachte große Interesse und für die Hilfe herzlich zu danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533913_0020

Inhaltsangabe

Nr.	Kapitel	Seite
1.	Einführung und Problemstellung	7
2.	Übersicht über die Bedeutung des NAD und den Reaktionsmechanismus der Wasserstoffübertragung	15
2.1.	Begriff des Coenzyms und dessen Wirkungsmechanismus	15
2.2.	Coenzym und Vitamin	16
2.3.	Bau der Coenzyme	17
2.4.	Aufbau und Bedeutung des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids (NAD)	17
2.5.	Funktion des NAD^+	18
2.6.	Der Reaktionsmechanismus	19
2.7.	Biosynthese und Abbau des NAD	22
3.	Übersicht über NAD-Analoge	24
3.1.	Funktion der Carbamido- bzw. Carbonyl-Gruppe am Pyridinring des NAD	24
3.2.	Einige dargestellte NAD-Analoge	24
3.3.	Besprechung einiger NAD-Analoge	31
3.4.	Pharmakologische Eigenschaften einiger NAD-Analoge und deren Vorstufen	38
4.	Übersicht über Chemosterilantien, Insektizide und deren Wirkungsweise	40
4.1.	Sexualsterilisierung und Chemosterilantien	41
4.2.	Die Wirkungsweise der Chemosterilantien	43
4.3.	Anwendungsmethoden der Chemosterilantien	45
4.4.	Insektizide und deren Wirkungsweise	46
4.5.	Bemerkungen über Wirkungsmechanismustheorien der Insektizide	47
4.6.	Wirkungsmechanismus und Toxizität einiger Insektizide	49
5.	Allgemeiner experimenteller Teil	54
5.1.	Einleitung zum experimentellen Teil	54
5.2.	Allgemeine Ausführung über den Syntheseweg	59

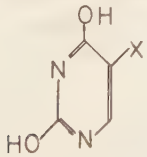
Nr.	Kapitel	Seite
5.2.1.	Synthese der 1-Chlor-Kohlenhydrat-Derivate	59
5.2.2.	Darstellung der Nicotinylaminosäureester	60
5.2.3.	Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate	63
5.3.	Untersuchungen zur Konstitutionsbestimmung	65
5.3.1.	Analytische Untersuchungen der Nicotinylaminosäureester	67
5.3.2.	Analytische Untersuchungen der benzoylierten Nucleosid-Derivate	67
5.3.3.	Spezielle analytische Untersuchungsmethoden	76
5.3.3.1.	Konstitutionsbestimmung durch Infrarotspektroskopie	76
5.3.3.2.	Deutung der Absorptionsspektren der Nicotinylaminosäureester	77
5.3.3.3.	Deutung der Absorptionsspektren der benzoylierten Nucleosid-Derivate	83
5.3.3.4.	Untersuchungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	93
5.3.4.	Molgewichtsbestimmung	107
5.4.	Beschreibung der Reaktionsprodukte	107
5.4.1.	Beschreibung der Nicotinylaminosäureester	107
5.4.2.	Beschreibung der benzoylierten Nucleosid-Derivate	109
5.5.	Übersicht über die gültigen Vorschriften zur Darstellung der Nicotinylaminosäureester und der definiert reinen und verunreinigten benzoylierten Nucleosid-Derivate	119
5.5.1.	Gültige Vorschriften zur Synthese von Nicotinylaminosäureester	119
5.5.2.	Gültige Vorschriften zur Synthese von benzoylierten Nucleosid-Derivaten	120
6.	Prüfung der hergestellten Verbindungen auf Wirksamkeit an Insekten	136
7.	Versuche zur Darstellung eines NAD-Analogen auf dem enzymatischen Weg	146
7.1.	Einführung in den enzymatischen Teil	146

Nr.	Kapitel	Seite
7.2.	Präparative Gewinnung des Enzyms NAD-Glykohydrolase	148
7.2.1	Bestimmung der Enzymaktivitäten	150
7.2.2.	Herstellung einer größeren Menge des Enzyms	153
7.3.	Versuch der enzymatischen Darstellung des NAD-Analogen Nicotinylglycinäthylester-Adenin-Dinucleotid (NGÄEAD)	154
8.	Spezieller experimenteller Teil: Wiedergabe der Vorschriften: 1. der Ausgangsverbindungen, 2. der Nicotinylaminosäureester, 3. der Vor- und Hauptversuchsansätze der benzoylierten Nucleoside (gültige Vorschriften); eine zusammenfassende Besprechung der Versuchsbedingungen mit Tabellen und Vorschriften für Syntheseversuche weiterer Stufen	161
8.1.	Vorschriften zur Darstellung der Ausgangsverbindungen	161
8.2.	Vorschriften zur Darstellung der Komponenten von NAD-Analogen	169
8.2.1.	Vorschriften zur Darstellung der Nicotinylaminosäureester	169
8.2.2.	Vorschriften zur Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate	176
8.3.	Zusammenfassende Besprechung der Versuchsbedingungen mit Tabellen	245
8.3.1.	Über die Synthese der Nicotinylaminosäureester	245
8.3.2.	Über die Synthese der benzoylierten Nucleosid-Derivate	247
8.4.	Versuche zur Darstellung weiterer Synthesestufen in Richtung eines NAD-Analogen	271
9.	Zusammenfassung	277
10.	Literaturverzeichnis	280
11.	Lebenslauf	286

1. Einführung und Problemstellung

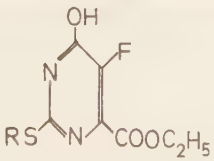
Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur chemischen und enzymatischen Synthese von NAD-Komponenten und -Analogen, insbesondere solcher im Nicotinsäure- und Ribose-Teil veränderten Verbindungen. Gleichzeitig sind die Untersuchungen ein Beitrag im Rahmen der seit einer Reihe von Jahren in unserem Arbeitskreis durchgeführten Arbeiten über Möglichkeiten, Stoffe als Stoffwechselhemmstoffe zur Schadinsektenbekämpfung zu entwickeln, die den Stoffwechsel und/oder die Generationsfolge der Insekten beeinflussen, ohne jedoch die toxikologischen und sonstigen Nebenwirkungen der gebräuchlichen Insektizide auf die Umwelt zu besitzen.

Diese Arbeit ist in gewisser Hinsicht eine Fortsetzung meiner Diplomarbeit (61.). In dieser Diplomarbeit (61.) wurden halogenierte, speziell fluorierte Verbindungen, wie Chlor- und Fluoruracil und Fluororotsäure-Derivate (I), mit der Zielsetzung hergestellt, daß diese Verbindungen auf die DNS des Zellkerns bei der Zellteilung einwirken, um die Generationsfolge bzw. die Vermehrung von Insekten zu hemmen. Das wurde auch an Hand von Versuchen an Taufliegen der Art Drosophila melanogaster untersucht (61.74.).



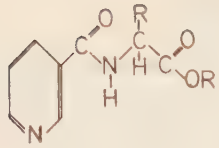
X : Cl–
F–

I



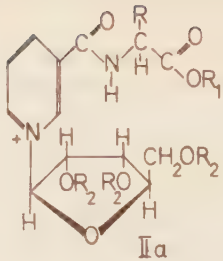
R : Alkyl–

In der vorliegenden Arbeit werden dagegen benzoylierte Nucleosid-Derivate bzw. Ribosyl-Derivate (IIa) und Nicotinylaminosäureester (IIb) dargestellt, die nicht direkt toxisch auf die DNS des Zellkerns wirken sollen, sondern mehr als Stoffwechselhemmstoffe, vielleicht auf die Coenzyme, besonders auf die wasserstoffübertragenden, um die Tiere konstitutionell so stark zu schwächen, daß die Generationsfolge bzw. ihre Vermehrung darunter leidet.



R: C_2H_5-

IIb



IIa

R_1: C_2H_5-

R_2: C_6H_5-C(=O)-

In der Diplomarbeit (61.) sollten die hergestellten Stoffe mehr als Sexualsterilantien wirken, während in dieser Arbeit versucht wird, weniger toxische Stoffe als Stoffwechselhemmstoffe wirken zu lassen, die auch zum Teil als Sexualsterilantien wirken, aber umweltfreundlicher sind, und, wie oben angeführt, nicht die problematischen Nebenwirkungen auf die Umwelt besitzen. Doch wird nicht ganz auf die Darstellung und Anwendung eines fluorbenzoylierten Produktes verzichtet, um eine Vergleichsmöglichkeit mit den nicht fluorhaltigen Verbindungen zu besitzen.

Auch sind diese hergestellten Derivate für einen anderen Kreis unserer Arbeitsgruppe (75.) interessant, um weitere Ansatzpunkte für die Untersuchung über die Bedeutung der durch NAD-Mangel hervorgerufenen Hemmung der Glykolyse nach Applikation von Cytostatika für die Tumorheilung zu erhalten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt bei der Herstellung von NAD-Komponenten und weniger bei der von NAD-Analogen. Dazu ist zu sagen, daß parallel zu dieser Arbeit von R. Riemschneider, M.C. da Rocha, G. Pollak, R. Weigele [(1967-1973) unveröffentlichte Arbeiten] eine Reihe von NAD-Analogen (Tabelle 2 unter den Nr. 1,8,12,18-22, 23-27, 29-33, 38,40,41) beschafft oder hergestellt wurden. Es sind solche, die inaktiv in Bezug auf eine wasserstoffübertragende Wirkund sind. Da nun die Prüfung der genannten Stoffe auf eine stoffwechselhemmende Wirkung nicht positiv verlaufen ist, erscheinen diese NAD-Analoge für die vorliegende Arbeit nicht mehr allzu interessant. Noch vor einigen Jahren war

die Herstellung von NAD-Analogen für diese Arbeit von Interesse, aber da diese NAD-Analogen vor 1-2 Jahren mit einem negativen Ergebnis geprüft wurden, wurde aus diesem Grunde die Synthese von weiteren NAD-Analogen zurückgestellt.

Aber es wurde trotzdem der Versuch unternommen, die Möglichkeiten einer enzymatischen Synthese eines NAD-Analogen, die in dieser Arbeit beschrieben wird, auch in Hinsicht auf die im vorstehenden Absatz genannte andere Problemstellung, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sein soll, durchzuführen.

Die Hauptproblemstellung dieser Arbeit wird im folgenden Teil erläutert:
Zum Punkt über die Entwicklung von Stoffen als Stoffwechselhemmstoffe ist zu sagen: Die bisher verwendeten Insektizide zeichnen sich dadurch aus, daß sie die Insekten abtöten, aber nicht nur die Schadinsekten, sondern auch die, die für uns von Nutzen sind, d.h. diese Verbindungen wirken zu unspezifisch. Gleichzeitig werden die Rückstände der Insektizide von den Pflanzen aufgenommen, haften oft an den Pflanzenoberflächen oder sammeln sich im Boden und gelangen dann, bevor sie abgebaut sind, über eine Nahrungskette vom Tier in den menschlichen Körper, vor allem wie beim DDT in das Fettgewebe, wo es gespeichert wird und toxische Erscheinungen hervorrufen kann. Das letztere gilt besonders für das DDT, das, da es eine lange Abbauzeit besitzt, schon weltweit verbreitet ist. Andere Insektizide, wie die Thiophosphorsäureester Parathion, Chlorthion u.a., werden zwar schneller abgebaut, sind aber für Warmblüter und für den Menschen giftiger und in der Handhabung gefährlicher.

Da man die Gefahr einer toxischen Verseuchung der Umwelt erkannt hat, laufen schon seit einigen Jahren Bestrebungen in die Richtung, Stoffe zu erzeugen, die in den Stoffwechsel der Insekten direkt eingreifen, ohne toxisch zu wirken, d.h. die als Stoffwechselhemmstoffe wirken. Zu diesen als Stoffwechselhemmstoffe zählende Verbindungen kann man Eiweißkörper, die unphysiologischen Aminosäuren, wie p-Chlor- oder p-Fluoralanin, enthalten, abgewandelte Nucleinsäure-

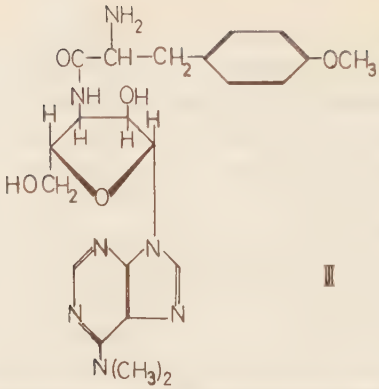
Komponenten, wie Fluororotsäure-Derivate, die im Stoffwechsel der Nucleinsäuren eingreifen können, oder, wie in dieser Arbeit, veränderte Komponenten von NAD-Analogen, die einerseits die enzymatische Wirkung des Coenzyms NAD beeinflussen könnten, andererseits auf die Umwelt selbst oder mit ihren Abbauprodukten nicht toxisch wirken, und von denen man annehmen kann, daß sie leicht abgebaut werden können.

Die Auswahl dieser (veränderten) abgewandelten NAD-Komponenten Nicotinylaminosäureester und benzoylierte Nucleosid-Derivate erfolgt nach folgenden Gesichtspunkten: Es ist bekannt, daß Stoffe, die als Stoffwechselhemmstoffe wirken sollen, den natürlichen, physiologisch wirksamen Verbindungen möglichst konstitutionell verwandt sein sollen. In ihrem Molekulargewicht und ihrer Molekülgröße dürfen diese unphysiologischen, stoffwechselhemmenden Stoffe von den natürlichen nicht zu stark verschieden sein, um eine Wirkung auf den Stoffwechsel zu gewährleisten. Dabei spielt eine gewisse Konkurrenz der unphysiologischen zu den physiologisch wirksamen Stoffen eine Rolle, da die letzteren bei der Bildung des NAD-Moleküls, oder bei dem Einbau in eine Nucleinsäurekette oder in ein größeres Protein verdrängt werden können. Das kann man erreichen, indem man Aminosäuren verwendet, die ein Fremdelement enthalten, beispielsweise Fluor, Chlor oder Brom oder eine zusätzliche funktionelle Gruppe, wie die Methylgruppe.

Hierbei besteht die Gefahr, daß Halogene als Fremdatome in einer vorher physiologisch wirksamen, aber jetzt abgewandelten Verbindung toxisch auf andere Enzyme wirken können, die z.B. die chemische Reizleitung des Nervensystems oder einen Stoffwechselkreislauf oder die Atmung beeinflussen. In diesem Fall sind dann halogenfreie Verbindungen besser, da diese weniger toxisch wirken und deren Abbauprodukte keine Toxizität zeigen. Dazu gehören Aminosäuren mit einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, wie methylierte Glutaminsäure, welche einerseits nicht toxisch wirkt, andererseits leicht in einen Eiweißkörper eingebaut werden kann und dort wegen ihrer veränderten Konstitution eine Wirkung hervorrufen kann.

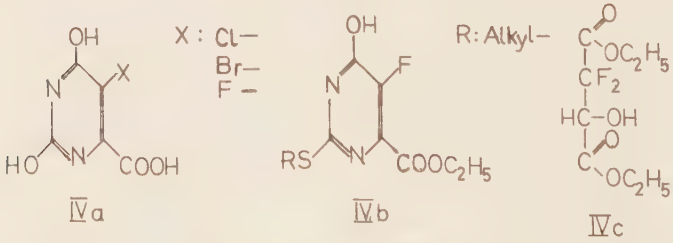
Die Darstellung dieser mit Halogen-Atomen und/oder mit kleinen funktionellen Gruppen veränderten physiologisch wirksamen Verbindungen (substitutierte Kohlenhydrate, Pyrimidin- und Pyridin-Derivate oder halogenierte Aminosäuren) erwies sich durch langjährige Erfahrungen bei Synthesen, die bei uns durchgeführt wurden, als schwierig. Diese Schwierigkeiten wurden umgangen, indem man, wie in dieser Arbeit, einem größeren Teilstück des NAD-Moleküls, dem Nicotinamid-Ribosid-Teil, einen weiteren kleineren Baustein, eine veresterte Aminosäure an die Carboxamido-Gruppe des Pyridinringes anhängt und auch die OH-Gruppen benzoylierte, was durch Kupplung eines Nicotinylaminosäureesters mit einer benzoylierten Ribose erreicht wurde. Wir haben somit die Carboxamido-Gruppe des Pyridin-Ringes, die auf die H_2-übertragende Wirkung des Coenzyms NAD durch Ausbildung einer konjugierten Doppelbindung zum Pyridinring einen Einfluß hat, durch Bildung einer peptidähnlichen Bindung verändert und auch die OH-Gruppen des Ribose-Teils blockiert, um eine stoffwechselbeeinflussende Wirkung zu verstärken. Dieses benzoylierte Nucleosid könnte, da die benzoylierten Gruppen auch wieder leicht abgespaltet werden können, im Körper in Konkurrenz zu dem physiologisch wirksamen Nucleosid eine Bildung des Coenzyms NAD behindern oder veränderte, weniger wirksame oder unwirksame NAD-Analoge bilden. Wichtig ist ferner, daß diese unphysiologischen Verbindungen bzw. Teilstücke eines physiologisch wirksamen Moleküls von dem natürlichen Teilstück keine zu großen Molekülunterschiede im Gewicht und in der Größe aufweisen, damit die beabsichtigte Wirkung eintritt.

Es ist auch interessant, daß in der Natur abgewandelte Nucleoside als Antiobiotika vorkommen, z.B. Cordycepin, Nebularin, Puromycin (III), Amecitin u.a., die zum Teil ein dem eigentlichen Adenin-Nucleosidteil des NAD ähnliches Molekül oder ein durch zusätzliche funktionelle Gruppen mehr oder weniger stark verändertes Molekül (Amecitin) besitzen (60). Es dürfte auch noch von Interesse sein, inwieweit benzoylierte Nucleoside auf andere Lebewesen wirken und wie ihre Konstitution die Wirkung beeinflußt.



III

Experimentell wurden diese Verbindungen, die hier dargestellt wurden, an Taufliegen der Art Drosophila melanogaster verfüttert, wobei in ähnlicher Weise vorgegangen wurde, wie bei der Entwicklung von Chemosterilantien, die auch zur Gruppe der Stoffe gehören, die die Vermehrung der Insekten negativ beeinflussen. Die Versuche knüpfen an frühere Versuche an, die in unseren früheren Arbeiten (74., 61.) durchgeführt wurden, und in denen über die Synthese und Wirkung halogenierter Pyrimidinderivate bzw. Carbonsäuren berichtet wird. Es handelt sich dabei um Chlor- Brom- und Fluororotsäure (IVa), um die Vorstufen: die S-Alkylthio-fluororotsäureäthylester (IVb).



IVa IVb IVc

(S-Äthyl-, -n-Propyl-, -iso-Propyl-, -n-Butyl-, -iso-Butyl-, -Amyl-, -Hexyl-, -Heptyl-, -Octyl-, -Decyl-, -Cetyl-), S-Benzylthio-Fluororotsäureäthylester und Fluoräpfelsäureäthylester (IVc), die als Antagonisten der Nucleinsäure-Basen und wichtiger Stoffwechselverbindungen eine mehr oder weniger toxische Wirkung zeigen.

Die Syntheseversuche der angestrebten Verbindungsklasse erfolgten auf zwei Wegen: 1. auf dem chemischen Wege, wobei die Darstellung der Teilkomponenten aus Gründen, die weiter oben angegeben wurden, sehr in den Vordergrund der Arbeit gestellt wurde; 2. auf dem enzymatischen Wege, auf dem die Möglichkeiten einer Darstellung eines NAD-Analogen gezeigt wurden, wobei besonders der Austausch der Komponenten am NAD-Molekül durch das zuständige Enzym versucht wurde.

Bisher wurde nur die Problemstellung dieser vorliegenden Arbeit behandelt. Es erscheint nun als notwendig, eine kurze Übersicht über die Einteilung des folgenden Inhalts zu geben, bevor die Versuchsergebnisse im nachfolgenden experimentellen Teil wiedergegeben werden.

In dem nun folgenden Teil wird eine Übersicht 1.) über die Bedeutung des NAD und den Reaktionsmechanismus der Wasserstoffübertragung als Funktion des NAD im Stoffwechsel; 2.) über die Arten und Wirkungen von NAD-Analogen unter Anführung einer Tabelle von einigen bekannten NAD-Analogen und 3.) über Chemosterilantien und Insektizide gegeben.

Der jetzt folgende allgemeine experimentelle Teil gibt die Versuchsergebnisse der Arbeit wieder. Er ist in folgende Abschnitte unterteilt:

1. Einleitung zum Versuchsteil
2. Ausführungen über Synthesewege der Komponenten der NAD-Analoge:
   a.) Nicotinylaminosäureäthylester des Glycins, DL-α-Alanins, DL-Methionins, S-Benzyl-L-cysteins, der L(+)-Glutaminsäure, des DL-Tryptophans, DL-Lysins und des L(-)-Tyrosins und
   b.) der benzoylierten Nucleosid-Derivate: N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylaminosäureäthylester-, N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester- und N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] -nicotinylgly-

cinäthylester-N^1-chlorid;

3. Analytische Untersuchungsergebnisse zur Konstitutionsbestimmung
   a.) durch einfache qualitative und quantitative Analyse
   b.) durch Infrarotspektroskopie
   c.) durch Dünnschichtchromatographie
4. Beschreibung der Reaktionsprodukte und deren physikalische Eigenschaften
5. Wiedergabe der gültigen Vorschriften der definiert reinen und der verunreinigten Verbindungen der benzoylierten Nucleosid-Derivate
6. Prüfungsergebnisse der hergestellten Produkte auf Stoffwechselwirkung an Insekten
7. Versuche zur Darstellung eines NAD-Analogen auf dem enzymatischen Wege.

Der spezielle experimentelle Versuchsteil ist in folgende Abschnitte unterteilt:

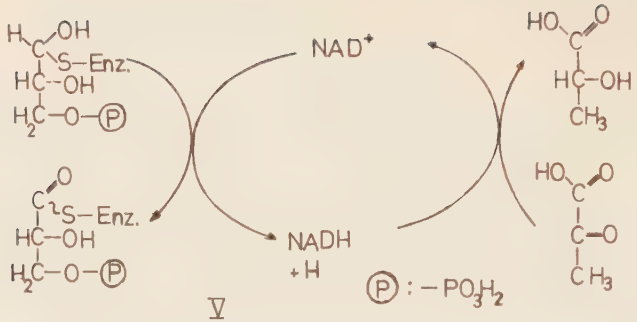
1. Synthesevorschriften der angeführten Verbindungen der Haupt- und Vorversuche
2. Besprechung der Haupt- und Vorversuche mit Tabellen und
3. Versuchsergebnisse zur Darstellung weiterer Stufen

2. Übersicht über die Bedeutung des NAD und den Reaktionsmechanismus

2.1. Begriff des Coenzyms und dessen Wirkungsmechanismus

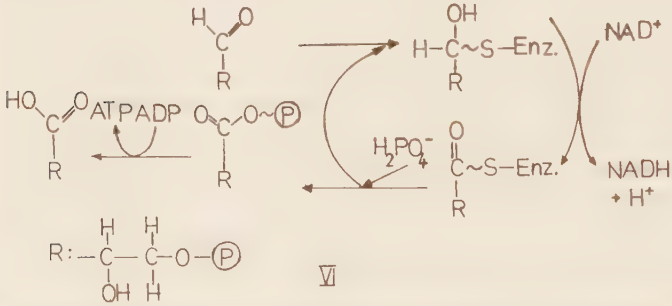
Enzyme, die zu den Proteinen zu rechnen sind, bestehen aus dem Proteinanteil, dem Apoenzym und einer Wirkgruppe, die entweder mit dem Protein fest verbunden oder als Coenzym leicht abdissoziierbar ist. Im ersten Fall nennt man diesen Anteil auch prosthetische Gruppe. Typische dissoziierbare Coenzyme sind z.B. das Adenosintriphosphat (ATP) und das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD). ATP liefert z.B. bei einer Hexokinase-Reaktion den Phosphatrest, NAD übernimmt vom Substrat den Wasserstoff. Beide Stoffe fungieren als ein zweites Substrat in stöchiometrischer Weise, wobei Mol pro Mol umgesetzt wird. In einer zweiten Reaktion, die durch ein anderes Enzymprotein katalysiert wird, kann das hydrierte NADH wieder seinen Wasserstoff abgeben, oder im Falle des ATP kann das Adenosindiphosphat (ADP) wieder Phosphat aufnehmen. Eine katalytische Wirkung des Coenzyms ergibt durch Kopplung mit den beiden Enzymen ein Enzymsystem. Da die Coenzyme zwischen verschiedenen Enzymen vermitteln, kommt ihnen im Stoffwechsel besondere Bedeutung zu: Sie stellen die Bindeglieder dar, durch die der Stoffwechsel erst in dem Umfange möglich wird, zumal diese Gruppen vom Coenzym meist in energiereicher Bindung aufgenommen werden. Sie werden nach Bücher "Transportmetaboliten" genannt (9.). Der schematisch dargestellte Vorgang (V) ist bei der anaeroben Glykolyse verwirklicht:

Im Rapoport (73.) wird bei der anaeroben Glykolyse das Glycerinaldehyd-3-phosphat durch das Enzym Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase (PGADH) mit NAD^+ als Coenzym zu Glycerinsäure-3-phosphat dehydriert, wodurch das NAD^+ zu dem NADH + H^+ hydriert wird. Dieses reduziert wiederum die Brenztraubensäure mittels des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu der Milchsäure. Dabei wird das NADH + H^+ wieder in das NAD^+ zurückverwandelt.



V

Man sieht, daß zwei Enzyme, LDH und PGADH, vermittels des NADH/NAD$^+$-Systems miteinander gekoppelt sind. Die Reaktionen sind grundsätzlich reversibel. Der Reaktionsablauf wird durch den Quotienten NAD$^+$/NADH sowie durch die Konzentration der Reaktionsteilnehmer bestimmt. Das NAD$^+$ wirkt in diesem System als katalytisches Zwischenprodukt.



VI

Der Feinmechanismus der Reaktion verläuft folgendermaßen: Eine essentielle SH-Gruppe, die im Enzym vorliegt, lagert sich im ersten Schritt an die Aldehydgruppe des Glycerinaldehyd-3-phosphats an. Sie wird danach durch NAD$^+$ dehydriert. Die Glycerinsäure wird dann phosphorolytisch vom Enzym als Glycerinsäure-1.3-diphosphat abgespalten (VI).

2.2. Coenzym und Vitamin

Viele Coenzyme stehen in naher Beziehung zu den Vitaminen, die biokatalytische Funktionen besitzen und oft Bestandteile eines Coenzyms sind. Ihr Fehlen in der Nahrung ruft

Avitaminosen hervor, die sich besonders als Haut- und Schleimhautsymptome offenbaren.

2.3. Bau der Coenzyme

Ein wesentlicher Bestandteil der Coenzyme ist die Phosphorsäure, die oft in einer Bindungsart, welche als Nucleosidphosphat oder Nucleotid bezeichnet wird, vorliegt. Diese Nucleotide bestehen aus einer Base, einem Monosaccharid, fast immer Ribose und Phosphorsäure. Base und Zucker sind durch eine N-glycosidische Bindung, die Phosphorsäure über eine Hydroxylgruppe des Zuckers, miteinander verknüpft. In Tabelle 1 werden wasserstoffübertragende Coenzyme bzw. prosthetische Gruppen aufgestellt.

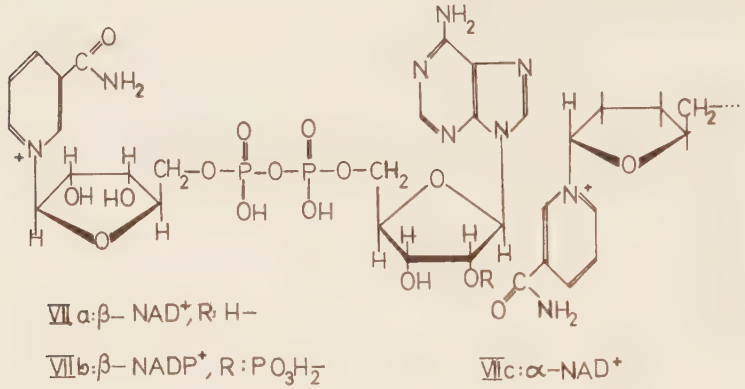
Tabelle 1

Coenzym bzw. prosthetische Gruppe	Abkürzung	zugehöriges Vitamin
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid	NAD^+	Nicotinsäureamid
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat	$NADP^+$	Nicotinsäureamid
Flavin-Mononucleotid	FMN	Riboflavin
Flavin-Adenin-Dinucleotid	FAD	Riboflavin

2.4. Aufbau und Bedeutung des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids (NAD).

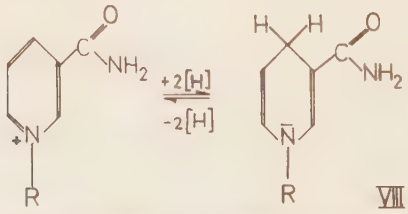
Die wichtigsten wasserstoffübertragenden Coenzyme der Enzymklasse der Oxidoreduktasen sind das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD,VIIa) und das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP,VIIb), deren eine Base das Pyridinderivat Nicotinsäureamid, die andere das Adenin ist. Beide Basen sind mit je einem Ribosemolekül über eine Pyrophosphat-

brücke, deren Enden mit den Ribosemolekülen in 5-Stellung verestert sind, verbunden. $NADP^+$ enthält außerdem in 2-Stellung der Ribose des Adenosinteils einen dritten Phosphorsäureester. Auch steht die Pyridinbase des aktiven NAD^+ zur Ribose in ß-Stellung (ß-NAD^+), dagegen bei dem inaktiven NAD^+ in α-Stellung (α-NAD^+, VIIc, 77.). (Siehe Kapitel 3.3.7.)



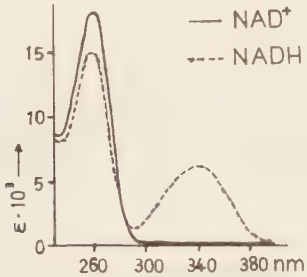
2.5. Funktion des NAD^+

Die Funktion des Coenzyms besteht in der reversiblen Aufnahme von Wasserstoff unter Reduzierung des Pyridinringes am C-4-Atom, der seine aromatischen Eigenschaften verliert und einen chinoiden Ring mit zwei Doppelbindungen unter Verlust der positiven Ladung am Pyridin-Stickstoffatom bildet (VIII).



Dadurch ändert sich gleichzeitig die Lichtabsorption, da der Dihydropyridinring ein neues Absorptionsmaximum bei 340 nm erzeugt. Entsteht nun während der Reaktion NADH, so

nimmt die Absorption bei 340 nm zu, die gut gemessen und optisch verfolgt werden kann. Die Zunahme der Absorption pro Zeiteinheit ist ein direktes Maß der Reaktionsgeschwindigkeit, die bei hoher Substratkonzentration der Enzymkonzentration proportional ist (IX).

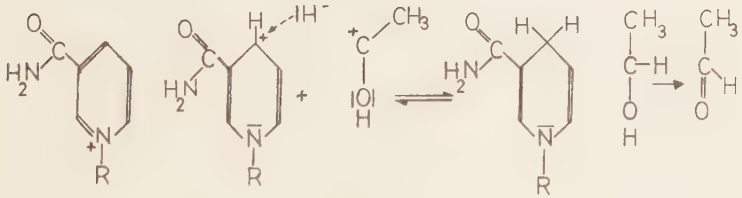


IX

2.6. Der Reaktionsmechanismus

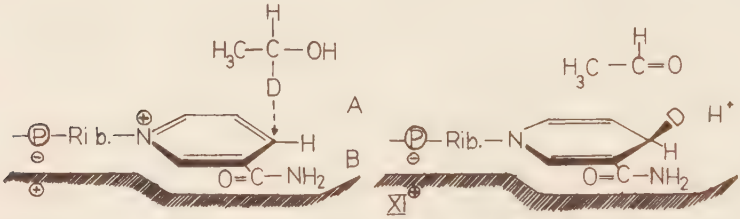
Das Pyridinnucleotid NAD^+ ist ein Coenzym zahlreicher Dehydrogenasen, vor allem der für die Dehydrierung primärer und sekundärer Alkoholgruppen. Im allgemeinen ist die Reaktion reversibel, und in der reversiblen Übertragung von Wasserstoff liegt die allgemeine Bedeutung dieser dissoziierbaren Coenzyme, die auch Transportmetaboliten genannt werden, da sie den Wasserstofftransport in der Zelle übernehmen (9.).

Die Untersuchungen des Reaktionsmechanismus ergeben, daß der Wasserstoff, der an den Pyridinring angelagert wird, als Hydrid-Ion übertragen wird. Das NAD^+ reagiert aus einer mesomeren Form, die die Ladung in die C-4-Stellung trägt (X, 43.).



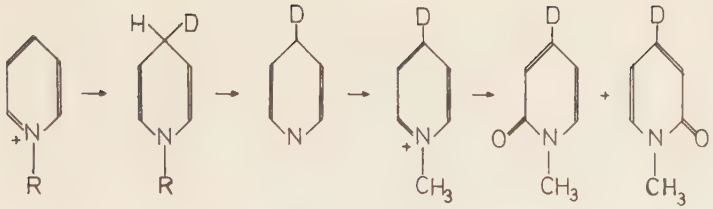
X

Die Reaktion ist auch stereospezifisch, wie man durch Deuteriummarkierung zeigen kann. Nach Karlson (XI, 43.) kommt das Deuterid-Ion von oben an den Pyridinring heran, der möglicherweise flach auf der Proteinoberfläche liegt.



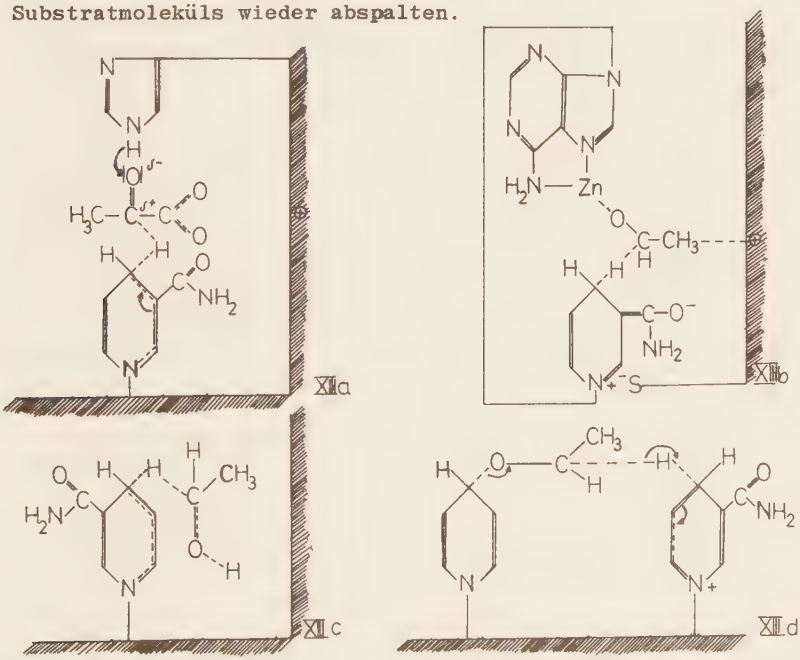
Es hängt nun von der Anordung der Haftstellen für das Ribosephosphat und für die $-CONH_2$-Gruppe auf der Enzymoberfläche ab, welche Seite des Pyridinringes für die Reaktion zugänglich ist. Die Seite, die z.B. bei der Dehydrierung von Äthanol durch Alkohol-Dehydrogenase und von Milchsäure durch Milchsäure-Dehydrogenase mit Wasserstoff beladen wird, wird als A-Seite, die andere, mit B-Seite bezeichnet, wird von der Glucose-Dehydrogenase oder Triosephosphat-Dehydrogenase angegriffen. Das NAD^+ wird von je einem der Enzympaare, die eng zusammenarbeiten, von beiden Seiten eingeschlossen. Der Wasserstoff wird vom 1. Substrat auf die A-Seite übertragen. Dann wird der B-ständige Wasserstoff abgelöst und auf das 2. Substrat übertragen. Von der A-Seite wird wieder neuer Wasserstoff angelagert.

Die Hydrierung des NAD^+-Moleküls erfolgt am C-4-Atom. M.E. Pullmann und Mitarbeiter (72.) zeigten am Beispiel des N^1-Methylpyridins mittels Deuterierung am C-4-Atom, anschließender Reduktion des Pyridinringes, Abspaltung der Alkylgruppe, Methylierung und Oxydation zu einem Gemisch von N^1-Methylpyridon-(2) und -(6), daß die Reduktion des NAD^+ in der 4- statt in der 2-Stellung des Pyridinringes geschieht. Das Gleiche wird auch von anderen Autoren bestätigt (XII).



XII

Es werden von verschiedenen Autoren die Übergangszustände für vier Dehydrierungsmechanismen wiedergegeben (22.,49., 88.,92.). Danach reagiert das NAD^+-Molekül mit seinen funktionellen Gruppen, die sich am Pyridinring und Purinring befinden, und mit der leicht veränderlichen Doppelbindung am C-4-Atom des Pyridinringes unter Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Substrat, die sich dann unter Reduktion des NAD^+-Moleküls zu NADH und gleichzeitiger Dehydrierung des Substratmoleküls wieder abspalten.



XIIa XIIb XIIc XIId

Bei den Mechanismen der Abbildungen XIIIa und XIIIb besitzen die Enzymproteine für das Substratmolekül separate Bindungsstellen, wobei bei dem Mechanismus XIIIa das Coenzymmolekül keinen Einfluß auf diese Bindungsstellen ausübt, aber bei XIIIb diese beeinflußt. Bei den Mechanismen XIIIc und XIIId ist das Coenzymmolekül der Bindungspartner für das Substratmolekül; dabei dient bei XIIIc ein Coenzymmolekül als Bindungspartner und Hydridionen-Acceptor, bei XIIId ein Coenzymmolekül als Bindungspartner und ein zweites als Hydridionen-Acceptor. Ferner sei noch vermerkt, daß bei den enzymatischen Reaktionen auch Metallionen wie Zn^{++} eine Rolle spielen, indem diese mit den Coenzymmolekülen in der Nähe der Apoenzymoberfläche Komplexe bilden (XIIIb).

2.7. Biosynthese und Abbau des NAD

Die Biosynthese des NAD beginnt mit der Bildung der beiden Teilstücke des Moleküls, des Nicotinsäureamidribosyl-Phosphats und des Adenosintriphosphats, die auch als Mononucleotide bezeichnet werden.

Das erste Teilstück wird nach J. Preiss und Ph. Handler (70.,71.) aus Nicotinsäure gebildet. Sie bewiesen diese These am Lactobacillus arabinosus, der bei einem Mangel an Nicotinsäure und Nicotinamid sofort NAD^+ aus diesen beiden Stoffen bilden kann, und an Zellsuspensionen, die Nicotinamid zur Nicotinsäure so schnell desamidieren, daß eine Synthese des NAD^+ aus Nicotinamid unwahrscheinlich erscheint. Nach beiden Autoren verläuft die Biosynthese nach folgendem Schema:

a) Nicotinsäure + Phosphoribose-1-pyrophosphat (PRPP) $\longrightarrow$ Nicotinsäuremononucleotid (Nicotinsäure-MN) + Pyrophosphat (PP)

b) Adenosintriphosphat (ATP) + Nicotinsäure-MN $\rightleftharpoons$ Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid (Nicotinsäure-AD^+) + PP

c) Nicotinsäure-AD^+ + Glutamin + ATP $\longrightarrow$ NAD^+ + Glutamat + Adenosinmonophosphat + PP

Nicotinsäure wird durch Phosphoribose-1-pyrophosphat unter katalytischer Mitwirkung eines Enzyms, das sich von der NMN-Pyrophosphorylase unterscheidet, in das Nicotinsäure-MN unter Pyrophosphat-Abgabe umgewandelt, welches nachfolgend mit Adenosintriphosphat unter erneuter Pyrophosphat-Abgabe zu Nicotinsäure-AD^+ verknüpft wird. Diese wiederum wird durch Glutamin zum NAD^+ überführt. Die beiden letzten Reaktionen werden von der NAD-Pyrophosphorylase bzw. von der NAD-Synthetase katalysiert.

Der Abbau des NAD^+ erfolgt durch drei Enzymgruppen: Nucleosidasen (E.C. 3.2.2.5), Pyrophosphatasen (E.C. 3.6.1.9) und Pyrophosphorylasen (E.C. 2.7.7.1). Die Nucleosidasen spalten nach Versuchsergebnissen von Mann und Quastel (56.), Handler und Klein (31.) und Mc Ilwain und Rodnight (59.) das Pyridinnucleotid NAD^+ hydrolytisch in Nicotinsäureamid und Adenosin-pyrophosphat-1'-ribosid (ARPPR). Dabei zeigt es sich, daß die oxydierte Form des Coenzyms von der Nucleosidase enzymatisch hydrolysiert wird. Die enzymatische Spaltung des $NADP^+$ erfolgt nach Kaplan, Colowick und Nason (37.) nach dem gleichen Prinzip.

Durch Pyrophosphatasen wird das NAD^+-Molekül an der Pyrophosphatbrücke in Adenosinmonophosphat (AMP) und Nicotinamid-mononucleotid (NMN) gespalten. Jacobson und Kaplan (36.) fanden eine geringere Pyrophosphat-Aktivität in den Komponenten der meisten Organe als die der Nucleosidasen.

Schließlich konnte Kornberg (43.) aus Hefe und Leber eine Pyrophosphorylase isolieren, die NAD^+ in Anwesenheit von Pyrophosphat in ATP und NMN spaltet. NMN wird anschließend in Nicotinamid-ribosid und Phosphat gespalten, das erste mit Phosphat wiederum in Nicotinsäureamid und Ribose-1-phosphat.

3. Übersicht über NAD-Analoge

3.1. Funktion der Carbamido- bzw. Carbonyl-Gruppe am Pyridinring des NAD

Das NAD^+-Molekül dient als Wasserstoffüberträger bei enzymatischen Reaktionen, besonders in der Atmungskette als Enzym mit dem negativsten Potential. Die Wasserstoffübertragung erfolgt dabei ausschließlich am C-4-Atom des Pyridinringes, wo sich ein Wasserstoffion anlagert. Dadurch bildet sich eine chinoide Doppelbindungsstruktur aus. Die Carbonyl- bzw. Carbamido-Gruppe am C-3-Atom spielt ebenfalls eine Rolle, da das Carbonyl-C-Atom durch Ausbildung einer Doppelbindung in Konjugation zum Ring gebracht wird. Dabei entsteht am O-Atom der Carbonylgruppe eine negative, am N-Atom des Pyridinringes eine positive Ladung. Es wird nun in dieser Arbeit auch die Frage aufgestellt, ob durch Substitution an der Carbonyl- bzw. Carbamido-Gruppe oder durch Ersatz dieser die enzymatische Aktivität verändert werden kann. Die Ergebnisse sind nach der Tabelle 2 recht verschieden.

3.2. Einige dargestellte NAD-Analoge

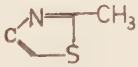
Tabelle 2 (27.)

1. Veränderungen im Nicotinamid-Mononucleotid-Molekülteil des NAD.

1.1. Veränderte Substituenten am Pyridinring des Nicotinamid-Mononucleotid-Molekülteils des NAD, dessen zweite Base Adenin (A) ist (Nr. 1-43); z.B. Pyridin-AD (PAD) für Pyridin-Adenin-Dinucleotid, 3- = Substituent in 3-Stellung des Pyridinringes.

Tabelle 2 (27.)

Nr.	Substituent	Bezeichnung	enzm.Akt.	Literatur
1	3 - H	Pyridin - AD	-	(38.)
2	3 - C(=O) - H	Pyridin-3-aldehyd - AD	+	(38.,39.)
3	3 - C(=O) - CH_3	3-Acetylpyridin - AD	+	(38.,39.)
4	3 - C(=O) - $CH(CH_3)_2$	3-Isobutyrylpyridin - AD	+	(4.,5.)
5	3 - C(=O) - CH_2-CH_3	3-Propionylpyridin - AD	+	(40.)
6	3 - C(=O) - CH_2-CH_2-CH_3	3-Butyrylpyridin - AD	+	(40.)
7	3 - C(=O) - C_6H_5	3-Benzoylpyridin - AD	+	(4.,5.)
8	3 - C(=O) - OH	Nicotinsäure - AD	-	(50.)
9	3 - C(=O) - OC_2H_5	Nicotinsäureäthylester - AD	-	(50.)
10	3 - C(=O) - NHOH	Nicotinhydroxamsäure - AD	+	(4.,5.)
11	3 - C(=O) - NH-NH_2	Nicotinsäurehydrazid - AD	+	(4.,5.)
12	3 - CH_3	3-Methylpyridin - AD	-	(38.)
13	3 - CHOH - CH_3	3-(1-Hydroxyäthyl)-pyridin - AD	-	(38.)
14	3 - CH = NOH	3-Pyridinaldoxim - AD	+	(4.,5.)
15	3 - NH_2	3-Aminopyridin - AD	-	(4.,5.,91.)
16	3 - NH-C(=O) - CH_3	3-Acetaminopyridin - AD	-	(4.,5.)
17	3 - C(=S) - NH_2	3-Thionicotinamid - AD	+	(4.,5.)

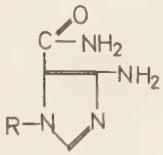
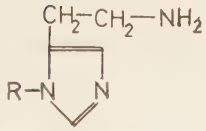
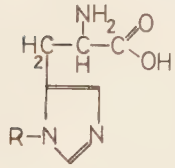
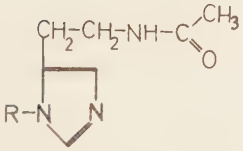
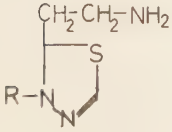
Nr.	Substituent	Bezeichnung	enzm.Akt.	Literatur
18	3 - 	3-(2-Methyl-1.3-thiazolyl)-pyridin - AD	-	(89.)
19	3 - $CH{=}CH{-}C(=O){-}NH_2$	3-Pyridylacrylamido - AD	-	(4.,5.)
20	3 - $C(=O){-}NH{-}CH_2CH_3$	3-Nicotinsäure-N-äthylamid - AD	-	(38.)
21	4 - $C(=O){-}NH{-}NH_2$	Isonicotinsäurehydrazid - AD	-	(105.)
22	4 - $C(=O){-}NH{-}NH{-}CH(CH_3)_2$	Isonicotinsäure-(N_2-isopropyl)-AD	-	(105.)

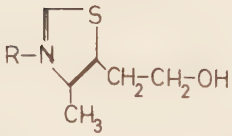
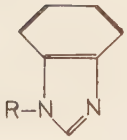
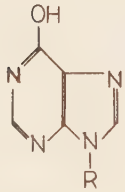
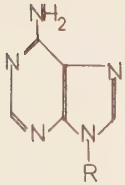
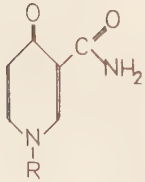
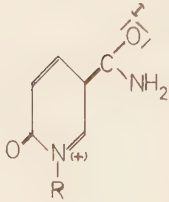
1.2. Substituenten, die am Pyridinring zuzüglich zur 3-Carboxamido-Gruppe vorhanden sind:

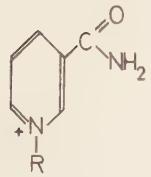
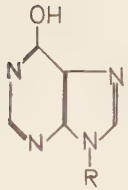
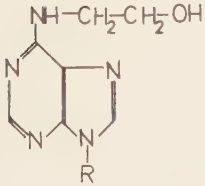
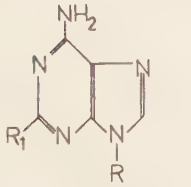
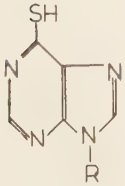
23	4 -	4-(1-Imidazolyl)-pyridin-3-carboxamid - AD	-	(23.)
24	4 - $CHOH{-}C(=O){-}CH_2OH$	4-[1.3-Dihydroxypropanonyl-(2)]-pyridin-3-carboxamid - AD	-	(10.,11.)
25	4 - $CH_2{-}C(=O){-}CH_3$	4-[Propanonyl-(2)]-pyridin-3-carboxamid - AD	-	(10.,11.)
26	4 - OCH_3	4-Methoxypyridin-3-carboxamid - AD	-	(64.)
27	4 - $CH_2{-}CHOH{-}C(=O){-}H$	4-[2-Hydroxypropanalyl-(3)]-pyridin-3-carboxamid - AD	-	(10.,11.)
28	4 - CH_3	4-Methylpyridin-3-carboxamid - AD	-	(91.)
29	5 - CH_3	5-Methylpyridin-3-carboxamid - AD	-	(40.,91.)
30	5 - NH_2	5-Aminopyridin-3-carboxamid - AD	-	(91.)

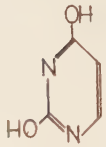
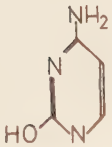
Nr.	Substituent	Bezeichnung	enzm.Akt.	Literatur
31	6 - NH_2	6-Aminopyridin-3-carboxamid - AD	-	(16.)

2. Ersatz des Pyridinringes (R : -AD)

32		4-Amino-5-carboxamino-imidazol - AD	-	(1.)
33		5-(2-Aminoäthyl)-imidazol - AD	-	(2.)
34		5-(2-Amino-2-carboxy-äthyl)-imidazol - AD	-	(3.)
35		Imidazol - AD	-	(3.)
36		5-(2-Acetylamino-äthyl)-imidazol - AD	-	(3.)
37		2-(2-Amino-äthyl)-thiadiazol - AD	-	(12.)

Nr.	Substituent	Bezeichnung	enzm.Akt.	Literat.
38		4-Methyl-5-(2-hydroxy-äthyl)-thiazol - AD	-	(24.)
39		Benzimidazol - AD	-	(3.)
40		Hypoxanthin - AD	-	(3.)
41		Adenin - AD	-	(80.)
42		3-Carboxamino-pyridon-(4) - AD	-	(65.)
43		3-Carboxamino-pyridon-(6) - AD	-	(53.)

Nr.	Substituent	Bezeichnung	enzm.Akt.	Lit.
3.	Veränderung am Adenylteil des NAD: Ersatz des Adenins (Nicotinamid - X - Dinucleotid = N - X - D)			
44		N-Nicotinamid - D	+	(26.,66., 80.)
45		N-Hypoxanthin - D	+	(41.,78.)
46		N-6-(2-Hydroxy-äthylamino)pu-rin - D	+	(93.)
47		N-2-(2-Hydroxy-äthyl)-6-amino-purin - D	+	(93.)
48		N-6-Mercaptopurin - D	+	(6.)

Nr.	Substituent	Bezeichnung	enzm.Akt.	Lit.
49		N-Uracil - D	+	(26.)
50		N-Cytosin - D	+	(66.)
4. Ersatz der Ribose				
		N-Desoxyadenosin - D	+	(26.,47.)
5. Doppelter Austausch				
5.1. Ersatz des Pyridin- und Adenylteils				
		3-Acetylpyridin-Hypoxanthin - D	+	(81.,25.)
		3-Carbonylpyridin-Hypoxanthin - D	+	(81.,25.)
		3-Carboxamino-4-(1-imidazolyl)-pyridin-Hypoxanthin - D	+	(66.)
5.2. Ersatz von Ribose und Adenin				
		Nicotinamid-Thymidylat - D	+	(26.)
6. Veränderungen am Pyrophosphatteil				
		NAD-monomethylester	-	(67.)
		NAD-dimethylester	-	(67.)

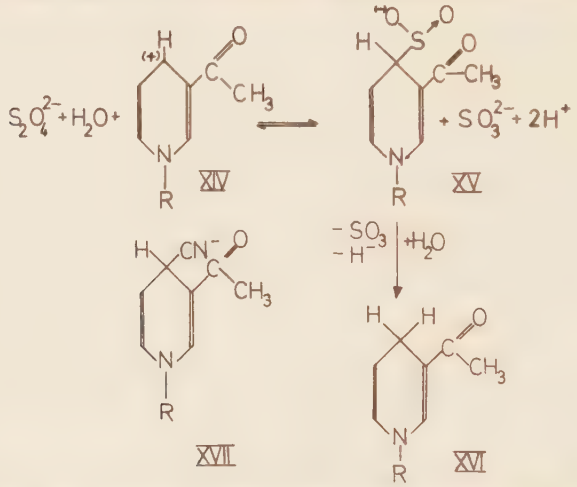
3.3. Besprechung einiger NAD-Analoge

Für die enzymatische Aktivität dieser NAD-Analoge erweist sich nach der Tabelle 2 eine in 3-Stellung des Pyridinringes direkt gebundene funktionelle Carbonylgruppe, die allein oder kombiniert mit einer aliphatischen Kette oder N-haltigen Gruppe verbunden ist, als notwendig. Dabei kann das O-Atom der Carbonylgruppe ($-C\overset{O}{\leftarrow}$) auch durch ein S-Atom ($-C\overset{S}{\leftarrow}$) ersetzt sein. Wichtig ist, daß an den elektronenanziehenden O- oder S-Atomen eine negative Ladung entsteht und durch Ausbildung einer Doppelbindung des Carbonyl-C-Atoms zum Ring hin und Bildung einer positiven Ladung am N-1-Atom des Pyridinringes eine Konjugation der Doppelbindungen als mesomere Grenzstruktur entsteht. Dagegen zeigen NAD-Analoge mit Substituenten am 4-, 5- oder 6-C-Atom des Pyridinringes, sowie Analoge mit einem anderen Ringsystem als dem des Pyridins keine Enzymaktivität. NAD-Analoge mit einem Pyridinring, der einen enzymatisch positiven Substituenten in 3-Stellung besitzt, aber mit einer anderen Purinbase als Adenin zeigen ebenfalls Enzymaktivität. Daraus ist zu schließen, daß Veränderungen am Pyridinring allein für die enzymatische Aktivität verantwortlich sind. Für die enzymatische Aktivität spielt offenbar auch der räumliche Bau des Moleküls eine Rolle. Dabei kommt dem Abstand zwischen den beiden Basen, der Pyridin- und der Adenin-Base, der nicht genau festlegbar, sondern eher auf Grund der Molekülstruktur dynamisch ist, eine gewisse Bedeutung zu. Dieser kann auch durch die Größe und Art der Substituenten beeinflußt werden. Desgleichen stellt auch die Fähigkeit der Bildung von Wasserstoffbrükken zwischen dem NAD-Analog-Molekül und dem Substratmolekül ein wichtiges Kriterium für die enzymatische Aktivität dar, wobei auch auf die Möglichkeit der Bildung negativer Ladungen am Carbonyl-C-Atom der Carbonylgruppe am Pyridinring hinzuweisen ist.

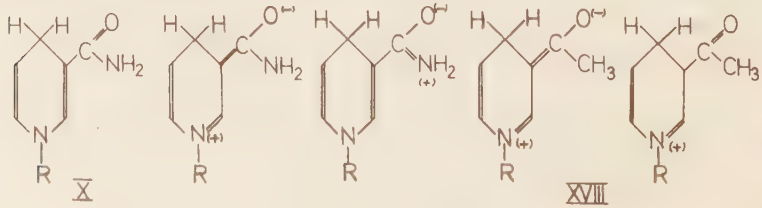
3.3.1. NAD-Analoge mit einem am Pyridinring veränderten Substituenten

Das 3-Acetylanaloge 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid

(3-APAD$^+$) besitzt mit dem natürlichen NAD$^+$ viele Ähnlichkeiten. Diese Verbindung (XIV) kann nach N.O. Kaplan (38.) enzymatisch oder chemisch mit Dithionit reduziert werden. Dabei bildet sie analog dem NAD$^+$ bei der chemischen Reduktion mit dem Sulfoxylat-Ion SO_2^{2-} eine Additionsverbindung als Zwischenstufe (XV), die bei anschließender Hydrolyse das reduzierte Produkt liefert (XVI). Desgleichen bildet diese Verbindung mit Cyanid eine Additionsverbindung (XVII).

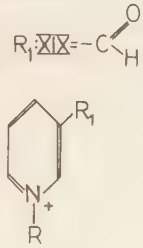


3-APADH hat ein Absorptionsmaximum des Lichtes bei 365 nm, verglichen mit 340 nm bei NADH (X). Die maximale Extinktion liegt also für das reduzierte Analoge 3-APADH (XVIII) im höheren Wellenbereich. Die Differenzen der Spektren zeigen eine größere Konjugationstendenz des 3-APAD$^+$, da eine größere Verschiebung zum langwelligeren Licht und ein größeres Maximum mit einem Konjugationsphänomen verbunden ist. Es ist möglich, daß NADH und 3-APADH in folgender Form vorliegen:



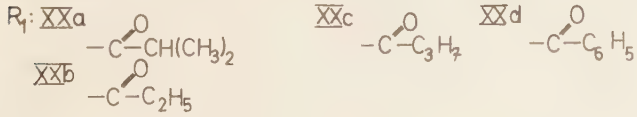
Dabei decken sich die spektralen Veränderungen mit der Tatsache, daß die Gruppierung $-\overset{O}{C}-CH_3$ eine größere Neigung zur Konjugation mit dem Pyridinring besitzt als die Säureamidgruppe. Die konjugierte Form ist nach den Autoren die stabilere Form, in der auch das NADH existiert.

Ein weiteres NAD-Analoge ist das Pyridin-3-aldehyd-Adenin-Dinucleotid (Py3AlAD), welches von N.O. Kaplan zusammen mit 3-APAD$^+$ enzymatisch untersucht und mit dem natürlichen NAD$^+$ verglichen wurde (XIX; 39.).



Die Autoren fanden, daß 3-APAD$^+$ mit der Alkoholdehydrogenase der Hefe nur mit 10% der Geschwindigkeit des NAD$^+$ reagiert. Für das Pyridin-3-aldehyd-Analoge Py3AlAD$^+$ liegt der Wert noch niedriger. Dagegen reagieren 3-APAD$^+$ und Py3AlAD$^+$ mit der Alkoholdehydrogenase der Pferdeleber im Sättigungsniveau schneller als NAD$^+$. Die K_m-Werte (K_m = Michaelis-Konstante) für die beiden Analoge sind annähernd gleich; jedoch sind die Affinitäten für das Pferdeleberenzym niedriger als die des NAD$^+$. Unterschiede treten auch in der enzymatischen Reduktion auf. Py3AlAD$^+$ wird durch die Lactatdehydrogenase des Rinderherzens mit höherer Geschwindigkeit reduziert als 3-APAD$^+$, wohingegen das gleiche Enzym aber vom Skelettmuskel des Kaninchens die Reaktion mit 3-APAD$^+$ begünstigt. 3-APAD$^+$ und 3-Acetylpyridin-Desamidoadenin-Dinucleotid konnten ferner bei der Oxydation von L-Malat zu Oxalacetat durch das Enzym L-Malat-Dehydrogenase NAD$^+$ als Substrat ersetzen (104.).

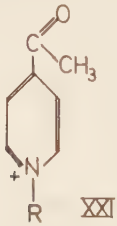
Einige weitere NAD$^+$-Analoge dieser Gruppe sind: 3-Isopropylcarbonyl- (XXa), 3-Äthylcarbonyl- (XXb), 3-Propylcarbonyl- (XXc) und 3-Benzoylpyridin-Adenin-Dinucleotid (XXd), die von N.O. Kaplan und Mitarbeitern synthetisiert und untersucht wurden (38.,39.,40.).



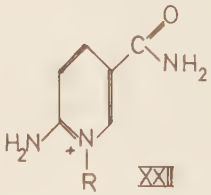
Sie zeigen alle eine enzymatische Aktivität. Außer diesen gibt es noch eine Reihe anderer, die hier nicht angeführt werden.

3.3.2. NAD-Analoge mit Substituenten in 4- oder 6-Stellung des Pyridinringes.

Eine zweite Gruppe NAD-Analoge sind die, in denen sich der Substituent oder ein zweiter am C-4- oder C-6-Atom statt am C-3-Atom des Pyridinringes befindet: 4-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid (4-APAD$^+$; XXI) und 6-Aminonicotinamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD$^+$, XXII, 16.).



XXI

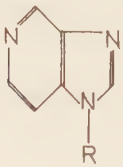


XXII

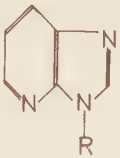
Die beiden NAD-Analoge haben noch eine besondere pharmakologische Bedeutung und werden zusammen mit anderen behandelt.

3.3.3. NAD-Analoge mit verändertem Purinteil

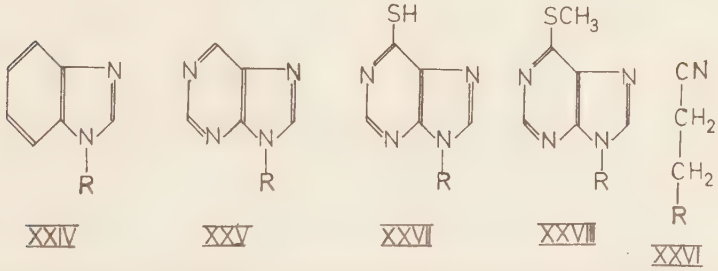
Außer NAD-Analoge mit Veränderungen am Pyridinring können auch dieselben mit einem veränderten Purinring hergestellt werden. Ch. Woenckhaus und G. Pfleiderer synthetisierten Nicotinamid-3- und -1-Desazapurin-Dinucleotid (NDD; XXIII, 96.,97.) aus den Teilstücken Nicotinamidmononucleotid (NMN) und 3-Desaza- bzw. 1-Desazapurinribosid-5'-phosphat durch Kondensation unter Mitwirkung von Dicyclohexylcarbodiimid.



XXIII



Das Coenzymmodell NDD^+ war im enzymatischen Test mit verschiedenen Dehydrogenasen ebenso wirksam mit NAD^+. Für die Funktion der Wasserstoffübertragung scheint der Stickstoff in 1-Stellung des Purinringes von Bedeutung zu sein. Auffällig ist ferner, daß die pK-Werte der nichtfunktionellen Mononucleotidteile bei Coenzymmodellen, die NAD^+ im enzymatischen Test ersetzen können; nicht über dem Wert 4 liegen. Das optische Verhalten dieser NAD-Analoge ähnelt nichtpurinhaltigen NAD-Analogen bzw. Coenzymmodellen, die sich alle bisher durch eine geringere Coenzymwirksamkeit auszeichnen. Die biochemischen Eigenschaften des Nicotinamid-3-Desazapurin-Dinucleotids (NDD^+) werden auch mit denen von NAD^+, Nicotinamid-Benzimidazol-Dinucleotid (NBD^+; XXIV), Nicotinamid-Purin-Dinucleotid (NPD^+; XXV) und dem NAD-Analogen ohne Purinteil Nicotinamid-ribotid-5'-pyrophosphat-cyanäthylester (NCE^+; XXVI) verglichen (98.,99.).

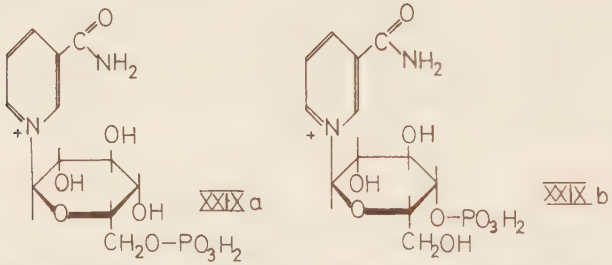


Ferner wurden noch die NAD-Analoge Nicotinamid-Thiopurin-Dinucleotid (NTD^+; XXVII) und Nicotinamid-Methylthiopurin-Dinucleotid ($NMTD^+$; XXVIII) synthetisiert und enzymatisch untersucht (68.).

Alle diese synthetisierten Verbindungen sind im Test mit Alkoholdehydrogenasen aus Leber und Hefe wie auch mit der Lactatdehydrogenase des Schweineherzens aktiv. Die K_m-Werte steigen mit Verminderung der Stickstoffatome an. Auch bei der Spaltung der Kartoffelpyrophosphatase nimmt die Reaktionsfähigkeit von NPD^+ über NDD^+ zum NBD^+ ab. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß ein intaktes Puringerüst für die Bindung und auch für die Aktivierung am Enzym von großer Bedeutung ist.

3.3.4. NAD-Analoge mit verändertem Kohlenhydratrest am Pyridinteil

Der Zuckerrest des NAD-Moleküls, die D-Ribose, kann durch einen anderen Zucker, in diesem Fall durch die D-Glucose ersetzt werden. So wurde zunächst Nicotinamid-N^1-ß-D-glucopyranosyl-6'-phosphat (XXIXa) synthetisiert. Dabei entstand ein Gemisch von 4'- (XXIXb) und 6'-Phosphat. Durch Umsetzen mit Adenosinmonophosphat und Dicyclohexylcarbodiimid erhielt man das NAD-Analoge Nicotinamidglucosid-Adenin-Dinucleotid als Isomerengemisch, das sich trotz starker Positivierung des C-4-Atoms am Pyridinring enzymatisch inaktiv verhält (100.).



3.3.5. NAD-Analoge mit einem ausgetauschten Pyridinteil

Eine neue Gruppe von NAD-Analogen besitzt an Stelle des Pyridinringes andere Ringsysteme, wie die von Imidazol, Histidin, Acetylhistidin, Benzimidazol, Hypoxanthin, Adenin und andere, welche sich alle als enzymatisch inaktiv erweisen (3.,80.).

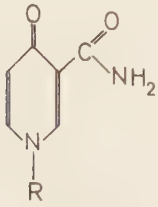
3.3.6. Oxydiertes NAD^+ als Analoges

Interessant sind auch die beiden oxydierten NAD-analogen Verbindungen:

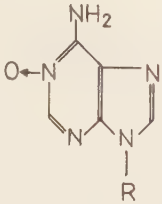
a) Nicotinamid-Adenin-N^1-oxyd-Dinucleotid ($NAOD^+$; XXX), das chemisch aus Nicotinamid-mononucleotid und Adenosin-5'-monophosphat-N^1-oxyd unter Einwirkung von Trifluoressigsäureanhydrid synthetisiert wird und

b) Pyrid-4-on-carboxamid-Adenin-Dinucleotid ($PCAD^+$; XXXI), das enzymatisch unter Einwirkung von Nucleosidase des Schweinegehirns aus NAD^+ und 4-Methoxynicotinamid über

das 4-Methoxy-NAD$^+$ gebildet wird (4.,64.,106.). Das erste Produkt NAOD$^+$ erweist sich trotz der wesentlich geänderten Elektronendichteverteilung im Purinteil des Moleküls in den biochemischen Eigenschaften gegenüber NAD$^+$ wenig verändert.



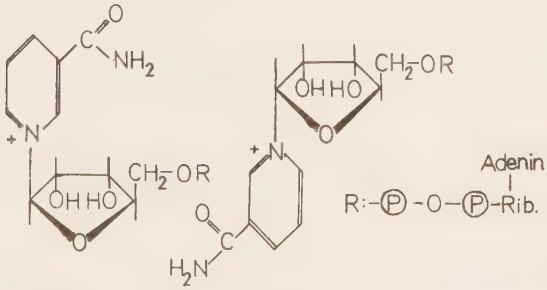
XXXI



XXX

3.3.7. α-NAD-Analoges

Im Gegensatz zum ß-NAD$^+$ (XXXII) steht die Pyridingruppe des α-NAD$^+$ (XXXIII) am C-1-Atom des Riboserestes in α-Stellung (101.).



XXXII XXXIII

Der Anteil des α-NAD$^+$ kann im Mikroorganismus bis zu 25% des Gesamt-NAD$^+$ ausmachen. Im Gegensatz zum natürlichen ß-NAD$^+$ besitzt dasselbe keine wasserstoffübertragende Coenzymfunktion. Die Bedeutung des α-Isomeren für den Zellstoffwechsel ist noch ungeklärt. Bei einigen chemischen Reaktionen des α-NAD$^+$ wurde eine teilweise Umwandlung in die ß-Form beobachtet: Reduktion des α-NAD$^+$ mit Na-Dithionit bei erhöhter Temperatur zu

α-NADH ergab, daß 25% vom NADH enzymatisch mit Alkoholdehydrogenase und Acetaldehyd unter Extinktionsabnahme bei 340nm reagieren. Im Ausgangsmaterial wurde kein ß-NAD^+ gefunden. Die Autoren vermuten, daß in der Zelle eine spezifische Mutorotase α-NAD^+ in die enzymatisch wirksame ß-Form überführt.

3.4. Pharmakologische Eigenschaften einiger NAD-Analoge und deren Vorstufen

NAD-Analoge können nicht nur teilweise chemisch synthetisiert, sondern aus Vorprodukten in der Zelle enzymatisch in vitro und in vivo gebildet werden. In diesem Fall handelt es sich um NAD-Analoge, die am Pyridinring verändert worden sind. Diese Veränderungen werden durch Zugabe einer abgewandelten Pyridin-Vorstufe, die über das abgewandelte NMN in das NAD-Analoge enzymatisch eingebaut wird, hervorgerufen. Einige dieser Pyridin-Derivate, die in der Zelle als Antimetaboliten des Nicotinamids auftreten, sind Thionicotinamid, 3-Acetylpyridin und 6-Aminonicotinamid. Diese sind nicht nur bis zu einem gewissen Grade toxisch, sondern sie rufen auch bei Tieren pathologische Symptome des Zentralnervensystems hervor: Sedation, Atoxia und Diarrhoe. Einige dieser Erscheinungen sind irreversibel. Untersuchungen an Ratten, die in vivo mit 100 mg/kg 3-Acetylpyridin bzw. 6-Aminonicotinamid behandelt worden sind, zeigten in ihren Gehirnen, daß über 5% des NAD^+ in 3-$APAD^+$, 10-20% in 6-$ANAD^+$ bzw. thio-NAD^+ transformiert wurden. Dabei resultiert die Bildung dieser unphysiologischen Pyridinnucleotide nicht im Verdrängen der physiologischen NAD^+, sondern der Gehalt der Nucleotide wächst in den Zellen durch Zugabe der unphysiologischen Vorstufen. 3-$APAD^+$ ist nur im Gehirn vorhanden, wohingegen 6-$ANAD^+$ und thio-NAD^+ in verschiedenen Organen gefunden wird. 3-$APAD^+$ und thio-NAD^+ können am Wasserstofftransport des Stoffwechsels teilnehmen, 6-$ANAD^+$ kann dagegen nicht hydriert werden.

Im Gegensatz zu 3-Acetylpyridin und 6-Aminonicotinamid ruft 4-Acetylpyridin, selbst wenn es in fünffach höherer Dosis über drei Wochen lang täglich appliziert wird, außer einer

kurz anhaltenden sedativen Wirkung keine toxischen Symptome hervor. 4-APAD$^+$ konnte in den Gehirnen der behandelten Tiere nicht nachgewiesen werden, obwohl das 4-Acetylpyridin unter vergleichbaren Bedingungen in vitro besser zum NAD(P)-Analogen synthetisiert wird, als das 3-Acetylpyridin. Es wird vermutet, daß 4-Acetylpyridin die Zellwand nicht durchdringen kann oder vom Organismus sehr schnell verändert wird. Die von A. Brunnemann und H. Coper (8.,14.) erhobenen Befunde scheinen im Widerspruch zu den Wirkungen von Isonicotinhydrazid als Vorstufe des Isonicotinhydrazid-Adenin-Dinucleotid (INH-AD$^+$) und von 6-Aminonicotinamid im Tier zu stehen. Obwohl beide Verbindungen die Zellwand passieren können, erzeugt nur 6-Aminonicotinamid Störungen, die sich durch nachgewiesene Bildung des NAD-Analogen erklären lassen.

Isonicotinhydrazid ist weniger toxisch, was das Fehlen des INH-AD$^+$ im Gehirn der Ratten erklärt. Diese Vorstufe wird offenbar von der Nucleosidase viel schlechter umgesetzt als 6-Aminonicotinamid, 3- und 4-Acetylpyridin. Dafür sprechen auch Syntheseversuche mit den beiden Antimetaboliten unter Verwendung eines Homogenats aus menschlichen Hirngeweben. Fast 40% der eingesetzten NADP$^+$-Menge sind am Ende des Versuchs in 6-ANADP$^+$ umgewandelt worden. Die Ausbeute an INH-ADP$^+$ bleibt gering.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sämtliche antimetabolitische Vorstufen des Nicotinamids, soweit diese durch die Zellmembrane dringen, über entsprechende NMN-Derivate die NAD-Analoge bilden können, welche kompetitiv oder nicht kompetitiv zum NAD$^+$ zu toxischen Erscheinungen führen. Dabei kann ihre geringe Aktivität als Wasserstoffüberträger oder ihre Nichtaktivität die Ursache sein.

4. Übersicht über die Chemosterilantien, Insektizide und deren Wirkungsweise

Dieses Kapitel über Chemosterilantien und Insektizide wurde aus dem Grunde angehängt, um den Unterschied zwischen stoffwechselbeeinflussenden Stoffen, wie die unphysiologischen NAD-Analogen, die noch eine Ähnlichkeit mit den natürlichen Stoffen besitzen, und den Insektiziden, die als reine Giftstoffe, den Stoffwechsel, speziell den Enzymstoffwechsel, stören und auf die Umwelt eine Giftwirkung ausüben, nochmals hervorzuheben.

Wie in dieser Arbeit bereits erwähnt, zeigen Fluor-Derivate von Nucleinsäure-Basen, wie Fluoruracil und dessen Vorstufe Fluororotsäure, insektizide, z.T. auch chemosterilisierende Effekte. Diese Verbindungen wirken als Stoffwechselhemmstoffe auch auf enzymatische Reaktionen. Die gleichen Wirkungen auf enzymatische Reaktionen im Stoffwechsel können auch unphysiologische NAD-Analoge hervorrufen, welche aber im Gegensatz zu den halogenierten Nucleinsäure-Basen auf die Umwelt weniger toxisch wirken. Aus diesem Grunde und aus schon weiter oben erläuterten Gründen wird in dieser Arbeit versucht, Nicotinylaminosäureester und solche mit Kohlenhydraten gekoppelten und als Komponenten von NAD-Analogen geltenden Nicotinylaminosäureester (benzoylierte Nucleosid-Derivate) darzustellen. Diese sind weniger toxisch und werden an Taufliegen verfüttert, um einen Effekt besonders in Hinblick auf Sexualsterilisierung und Stoffwechselhemmung zu erzielen. Diese NAD-Komponenten wurden auch deswegen ausgewählt, weil sie leicht in eine NAD-Vorstufe bzw. ein NAD-Derivat umwandelbar sind. Das wiederum eine mögliche Wirkung auf den Stoffwechsel oder die Atmung der Tiere ausübt.

Als erstes wird über die Arten der Sexualsterilisierung geschrieben: über die physikalische mittels energiereicher Strahlen und über die chemische mittels Chemosterilantien. Dabei werden die Verbindungsklassen aufgestellt und die Wirkungsweise dieser Verbindungen auf den Enzymstoffwechsel, auf das genetische Material und auf die RNS-Synthese bespro-

chen. Weiterhin werden Ausführungen über die Anwendungsmethoden gemacht. Zum Schluß wird eine Übersicht über die klassischen Schädlingsbekämpfungsmittel gegeben und deren Wirkungsweise unter besonderer Berücksichtigung der Konstitution behandelt.

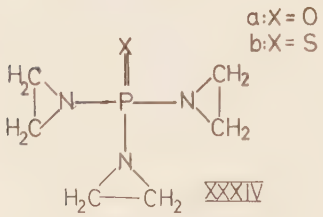
4.1. Sexualsterilisierung und Chemosterilantien

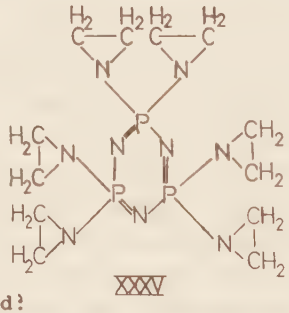
Insektizide und andere Pestizide, vor allem die schwer abbaubaren Chlorkohlenwasserstoffe, wie DDT u.a., erzeugen mehr oder weniger Rückstände in Nahrungs- und Futtermitteln, die dann direkt oder über eine Nahrungskette zum menschlichen Verbrauch gelangen. Da diese oft lipoidlöslich sind, finden wir diese meist im Fettgewebe der Tiere und der Menschen. Eine chronische Vergiftungsgefahr der Bevölkerung durch Pestizidrückstände scheint gegeben, kann aber noch nicht nachgewiesen werden. Daher ist man seit einigen Jahren bestrebt, durch intensivere Erforschung der Möglichkeiten einer biologischen Schädlingsbekämpfung diese Mittel weitgehend zu ersetzen. Das geschieht 1. durch Vermehrung der natürlichen Feinde dieser Schadinsekten mittels intensiver Züchtung, 2. durch Anwendung bestimmter Bakterien und Viren gegen die Schadinsekten und 3. durch die Sexualsterilisierung.

Bei der Sexualsterilisierung unterscheiden wir die physikalische und die chemische Methode: In der physikalischen werden energiereiche Strahlen, wie Röntgenstrahlen oder γ-Strahlen des Co^{60} verwendet. Durch Bestrahlung von männlichen oder weiblichen Tieren treten in deren Zellen neue instabile Verbindungen meist radikalischer Art auf, die durch Spaltung der Moleküle entstanden sind und sekundäre mutagene Effekte bewirken. Es werden Enzyme der Zellteilung inaktiviert, wodurch die Reduktionsteilung des Chromosomensatzes verhindert wird. Auch die DNS der Chromosomen kann man chemisch verändern. Bei der Paarung derart bestrahlter Männchen mit normalen Weibchen werden zwar die Eier befruchtet, aber sie entwickeln sich nicht, oder die Embryos sterben ab. Es ist nun möglich, eine große Anzahl Männchen dieser Schadinsekten zu züchten, sie

zu sterilisieren und dann in der betroffenen Gegend, in der diese Schadinsektenart sehr stark auftritt, fliegen zu lassen. Diese konkurrieren mit den normalen Männchen und vermindern auf diese Weise die Populationsdichte. Mit dieser Methode wurde auf der Insel Curaçao und im Südosten der USA die Schraubenwurm-Fliege Cochliomyia, die unter den Viehbeständen einen großen Schaden anrichtete, weitgehend ausgerottet (62.).

Die chemische Sterilisierung beruht auf früheren Beobachtungen über das Auftreten von Mutationen und Sterilität bei der Taufliege Drosophila melanogaster nach Aufnahme von Folinsäure-Antagonisten, Carbaminsäure-Derivaten und anderen chemischen Verbindungen. Zu diesen Verbindungen, die in der Literatur Chemosterilantien genannt werden, gehören als wichtigste Gruppe die Aziridine, Abkömmlinge der Äthylenimine:

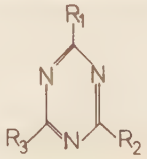




Die bekanntesten dieser Art sind:

TEPA: Tris-(1-aziridinyl)-phosphinoxid (XXXIVa); Thio-TEPA: Tris-(1-aziridinyl)-phosphonsulfid (XXXIVb); Metepa: Tris-(2-methyl-1-aziridinyl)-phosphinoxid; Aphomid: N.N'-Dimethyl-N.N'-di-[bis-(1-aziridinyl)phosphoryl]-äthylendiamin; Apholat: 2.2.4.4.6.6-Hexahydro-2.2.4.4.6.6-hexakis-(1-aziridinyl)-1.3.5.2.4.6-triazatriphosphorin (XXXV); Uredepa: Äthyl- [bis-(1-aziridinyl)phosphinyl]-carbamat u.a. (87.).

Ferner die s-Triazine (XXXVI):



2.4-Diamino-1.6-dimethylamino-, 2.4.6-Tris-(dimethylamino)-, 2-Amino-4.6-bis-(dimethylamino)-, 2.4.6-Tris-(dimethyl-

amino)-, 2.4.6-Tris-(methylamino)-, 2.4-Diamino-6-methoxy-, 2.4-Diamino-6-äthoxy-, 2.4-Diamino-6-pyrrolidinyl-, 2.4-Diamino-6-morpholino-s-triazin;

die Phosphoramide: N-(Hydroxymethyl)-N.N.N.N-pentamethylphosphorsäure-triamid; P-(1-Acetidinyl)-N.N.N.N-tetramethylphosphonsäureamid; P-(1-Acetidinyl)-N.N.N.N-tetramethylphosphonthionsäurediamid u.a.;

und Chemosterilantien verschiedener Verbindungsklassen: 1-(2-Chloräthyl)-3-äthyl-2-imidazolidinon; N.N-Bis-(2-chloräthyl)-2.6-xylidin; Na-(3.5-Dichlorphenyl)-trihydroxyborat-(1); Na-Trihydroxy-(m-nitrophenyl)-borat-(1), (p-Nitrophenyl)-harnstoff; 1-Äthyl-2-thioharnstoff; s-Triazol-3-thiol; Triphenylzinnacetat; Triphenylzinnhydroxyd u.a.

4.2. Die Wirkungsweise der Chemosterilantien

Die Wirkung der Chemosterilantien zeichnet sich dadurch aus, daß diese mit den Inhaltsstoffen des Zellkerns reagieren. Dabei treten feste Veränderungen an den Chromosomen auf: Chromosomenbrüche, Verklebungen und Mutationen der Gene durch Veränderungen an den Nucleinsäure-Basen. Die Zellteilung wird ebenfalls durch Hemmung der dafür zuständigen Enzyme beeinflußt. Die Folge ist, daß die Eier unfruchtbar bleiben oder die Embryos in den ersten Entwicklungsstadien absterben. Als Beispiel seien hier die Aziridin- bzw. Äthylenimin-Derivate angeführt, die verschiedene Enzyme und die DNS-Synthese in den Gonaden und in den Eiern hemmen (7.).

Der Sterilisierungseffekt wirkt sich meist selektiv auf das männliche oder weibliche Tier aus, bei einigen Verbindungen auch auf beide Geschlechter. Die Männchen behalten die beweglichen Spermien und bleiben befruchtungsfähig, doch die befruchteten Eier zeigen die schon oben erwähnten Sterilisierungseffekte. Bei einer Sterilisierung der Weibchen kommt es meist nicht zur Eiablage. Das Sexualverhalten der Tiere bleibt aber wie bei dem Bestrahlungsverfahren unverändert (7.).

Es wurden unter anderem erfolgreiche Versuche mit den Moskito-Arten Aedes und Culex und der mit der Hausfliege Musca domestica durchgeführt. Bei den Moskitos verursacht eine abgemessene Dosis der Chemosterilantien einen cytostatischen, mutagenen und cytotoxischen Effekt. Es werden die Gonaden durch die Behandlung beeinflußt und zeigen verschiedene Grade von Abnormitäten. Die spermatogene Aktivität wird in den Testes disharmonisch, und durch direkte Einwirkung dieser Verbindung werden Chromosomenbrüche induziert. In den Embryos finden wir gleichfalls Chromosomenanomalien, wie Brüche, dizentrische Chromosomen, die den Zelltod verursachen (7.).

Untersuchungen über die Art der Einwirkung von Chemosterilantien führten auch zu genaueren Kenntnissen in der Reproduktion der Tiere, besonders bei weiblichen Tieren. Viele Chemosterilantien, die in den Eiern diese Effekte bewirken, erzeugen auch die Unfruchtbarkeit, und Untersuchungen der Wirkungen dieser zeigen, daß diese keinen Einfluß auf das den gonotrophischen Zyklus steuernde Hormonsystem des Weibchens besitzen. Die Ovarien der behandelten Tiere zeigen eine Degeneration der Follikel, was die Vitellogenese der Eier behindert (7.).

Es wurden auch erfolgreiche Versuche mit der Hausfliege Musca domestica unter Verwendung von Aziridin-Derivaten durchgeführt. Man fand durch biochemische Untersuchungen chemosterilisierter Tiere, daß in den Ovarien der Weibchen weniger DNS, besonders wenige niedermolekulare DNS-Zwischenprodukte vorhanden sind. Obwohl auch die Menge an RNS und RNS-Zwischenprodukte von chemosterilisierten mit der unbehandelter Fliegen gleich scheint, ist das Purin/Pyrimidin-Verhältnis der RNS der Ovarien unbehandelter Fliegen höher als das der behandelten. In den lebensunfähigen Eiern chemosterilisierter Weibchen verläuft die Proteinsynthese normal, doch es wurde keine meßbare DNS-Synthese gefunden. Die RNS-Synthese ist auch geringer als in fruchtbaren. Das Purin/Pyrimidin-Verhältnis der RNS in Eiern normaler und chemosterilisierter Weibchen war bei frischgelegten zunächst gleich nor-

mal, nach 6 Stdn. Inkubation bei 37°C war das Verhältnis in der RNS chemosterilisierter bedeutend höher (28.).

Es wurde auch gefunden, daß Lactatdehydrogenase (LDH) chemosterilisierter Eier eine bedeutend geringere Aktivität besitzt als die normaler Eier. Das erklärt auch, daß diese LDH nur zwei Isoenzyme im Gegensatz bis zu fünf Isoenzyme der normalen LDH besitzt. Auch die Aktivität der Ribosomen in den Zellen normaler Eier ist 1,6 mal höher bei der Proteinsynthese als die chemosterilisierter (29.).

Auch solche Verbindungen, die mehr Antimetabolite sind, wie Fluoruracil wirken chemosterilant: Hausfliegen, die mit 5-Fluoruracil-2-C^{14} gefüttert wurden, zeigten eine Aufnahme des radioaktiven Materials in die Eier, deren Radioaktivität am ersten Tage nach der Eiablage am höchsten war. Die Lebensfähigkeit der Eier war während der ersten vier Tage nach der Eiablage sehr gering, wuchs aber dann nach dem vierten Tage mit Abnahme der Radioaktivität (45.).

4.3. Anwendungsmethoden der Chemosterilantien

Die wichtigste Anwendungsmethode für Chemosterilantien ist die "sterility control method". Die Prinzipien dieser Methode sind die, daß eine Population von Schadinsekten einen großen Anteil steriler, aber sexuell konkurrierender Mitglieder enthält, die zu einer Verringerung und schließlich zum Verschwinden dieser Population führt. Dazu ist es notwendig, ein stabiles Verhältnis zwischen sterilen und fruchtbaren Tieren dieser Population zu halten, das durch Zugabe künstlich erzeugter steriler Insekten oder durch Sterilisierung eines Teils der Population erzeugt wird.

Knipling (108.) erkannte bei dieser Methode die Bedeutung der Männchen. Betrachtet man beispielsweise eine Populationsdichte von 200 fruchtbaren, unbegatteten Fliegen, 100 Männchen und 100 Weibchen, von der je 50 getötet werden, so nimmt die Reproduktion um 50% ab. Wenn jedoch die gleiche Zahl (je 50) Fliegen sterilisiert wird, so erfolgt eine größere Abnahme der Reproduktion. Diese 50, in diesem

Fall sterile Weibchen, werden wieder der 50%igen Verminderung der Reproduktion zugezählt. Doch 25 der verbleibenden fruchtbaren Weibchen können sich mit sterilen Männchen begatten. Es ergibt sich dann eine zusätzliche Abnahme der Reproduktion von 25%, die Gesamtabnahme beträgt dann 75%, 25% ist der Bonus-Effekt. Die besondere Bedeutung der Männchen wird auch daran klar, daß männliche Insekten gewöhnlich polygam sind. Eine Zufuhr von sterilen Weibchen zur Populationsdichte hat einen geringeren Effekt auf die Begattungshäufigkeit der Männchen und auf die Begattung der fruchtbaren Tiere untereinander. Werden sterile Männchen zugegeben, so werden mehrere Weibchen von dem einzelnen männlichen, sterilen Tier begattet, und die Wirkung auf die Reproduktion zeigt sich in einer größeren Abnahme dieser (109.).

Die günstigste Methode zur Ausrottung einer Schadinsektenpopulation beim starken Auftreten ist die Vorbehandlung der befallenen Fläche mit Insektiziden, um zunächst die Populationsdichte zu senken. Dann wird mit sterilen Männchen, die in Konkurrenz mit den fruchtbaren stehen, die Vermehrungsrate auf ein Minimum herabgedrückt oder die ganze Population in dieser Gegend ausgerottet.

Eine andere günstige Kombination ist die von Chemosterilantien mit synthetischen Lockstoffen, speziell mit Sexuallockstoffen. Diese Gemische werden an bestimmten Orten des befallenen Gebietes ausgelegt, zu denen dann die Insekten hingezogen werden. Dort wird dann die eine Geschlechtsart der Schadinsekten sterilisiert und verringert dann durch die schon oben erwähnte Konkurrenz die Nachwuchsrate. Aus diesen Gründen brauchen diese Stoffe, deren Rückstände ebenfalls umweltbelastend sind, nicht über große Flächen zerstreut zu werden, sondern sie werden nur an wenigen Punkten konzentriert ausgelegt (62.)

4.4. Insektizide und deren Wirkungsweise

Die wichtigste Gruppe der Insektizide ist die Gruppe der synthetisch-organischen Insektizide, zu der folgende Verbindungsklassen gehören:

1. Die Diphenyläthan-Verbindungen: Dichlordiphenyltrichloräthan (DDT bzw. 1.1-Bis-(p-chlorphenyl)-2.2.2-trichloräthan); Dichlordiphenyldichloräthan (DDD bzw. 1.1-Bis-(p-chlorphenyl)-2.2-dichloräthan); Difluordiphenyl-trichlormethyl-methan (DFDT bzw. 1.1-Bis-(p-fluorphenyl)-2.2.2-trichloräthan u.a.

2. Die HCH-Verbindungen: γ -Hexachlorcyclohexan (Gammexan bzw. Lindan).

3. Die Dien-Verbindungen: Chlordan, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Thiodan u.a.

4. Die Phosphorsäureester-Verbindungen: TEPP (Tetraäthylpyrophosphat), OMPA (Octamethylpyrophosphorsäureamid), Parathion (E 605 bzw. O.O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat u.a.

5. Die Ester der Carbaminsäure: Dimetan (5.5-Dimethyl-4.5-dihydro-3-resorcyl-dimethylcarbamat) u.a.

6. Eine Gruppe von Verbindungen, die verschiedenen Verbindungsklassen angehören: Kelthan (1.1-Bis-(p-chlorphenyl)-tri-chloräthanol) u.a.

4.5. Bemerkungen über Wirkungsmechanismustheorien der Insektizide

Über den Wirkungsmechanismus wurden mehrere Theorien aufgestellt (76.), die kurz am Beispiel des DDT umrissen werden:

1. Eine Hydrolysetheorie von H. Martin und R.L. Wain (57.) Diese schreiben der Lipoidlöslichkeit des DDT-Moleküls den Chlorphenylgruppen zu, während sie für die toxische Wirkung die Trichlormethylgruppe auf Grund der Tatsache, daß sie leicht HCl abspaltet, verantwortlich machen.

2. Eine Theorie nach Läuger (52.), die die p-Chlorphenylgruppe des DDT-Moleküls als toxische Komponente ansieht, während die Trichlormethylgruppe in Analogie zu der weitgehenden Lipoidlöslichkeit des Chloroforms und ähnlicher Verbindungen dem Molekül eine hohe Lipoidlöslichkeit verleihen soll.

3. Die Narkosetheorie von Gavaudan (30.). Danach soll DDT ebenso wie viele andere Halogenkohlenwasserstoffe eine Narkosewirkung ausüben.

4. Die Cholinesterase - Inhibitor - Hypthese von Kearns u.a. (44.), in der die Vermutung ausgesprochen wird, daß der p.p'-DDT-Wirkstoff eine Inhibitorwirkung auf die Cholinesterase ausüben soll, was inzwischen teilweise bestätigt wurde (58.).

5. Eine Theorie, die aussagt, daß biologisch wirksame Substanzen ein biologisch aktives Zentrum besitzen (51.,72.). Im Fall des DDT ist es das von beiden Chlorphenylresten substituierte zentrale C-Atom, das auf Grund der Substituenteneffekte der beiden Chlorphenylgruppen und der Trichlormethylgruppe eine verringerte Elektronendichte besitzt. Eine derartige Anordnung elektronenanziehender Substituenten am C-Atom soll die Leichtigkeit der Bildung von Anlagerungskomplexen mit Enzymproteinen erklären.

6. Die Theorie von R. Riemschneider (76.b), die aussagt, daß die Aktivität eines Kontaktinsektizids und der Rotationsgrad der molekularen Komponenten des DDT und analoger Verbindungen in enger Beziehung zueinander stehen und durch Messungen der Dipolmomente gestützt wird.

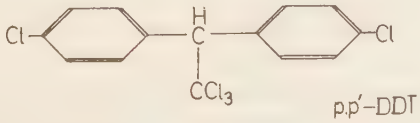
Dazu ist zu sagen, daß der spezifische Wirkungscharakter eines Insektizids nicht nur von der Art der wirksamen Molekülgruppen bzw. Atomen als Leitgruppen bzw. -atomen im Molekül abhängt, sondern auch von der Molekülgröße und vor allem von der sterischen Anordnung dieser Gruppen bzw. Atome zueinander und zum Gesamtmolekül, d.h. von der Konfiguration. Das DDT, das als technisches Produkt mehrere Ionen enthält, hat in der p.p'-Konfiguration die stärkste Wirksamkeit, in dem die Cl-Atome der beiden Chlorphenylgruppen in p-Stellung zum zentralen C-Atom stehen. Ebenfalls zeigt das Hexachlorcyclohexan in der γ-Konfiguration seine stärkste Wirkung. Die anderen Isomeren sind teils weniger wirksam, teils unwirksam. Es kann gesagt werden, daß eine durch die Konfiguration bedingte physikalisch-chemische Eigenschaft der Verbindung, etwa die Lipoidlöslichkeit, für die Giftwirkung zwar eine notwendi-

ge Bedingung ist, aber die charakteristische biologische Wirkung des p.p'-DDT dürfte sich jedoch weder durch diese eine Eigenschaft noch durch eine Teilkomponente des Moleküls voll erklären lassen. Es sind offenbar noch andere Teilkomponenten bzw. Eigenschaften notwendig. Daher muß der Begriff toxische Komponente für ein Insektizid sehr weit gefaßt werden (76.a).

4.6. Wirkungsmechanismus und Toxizität einiger Insektizide

Als erstes Beispiel wird das DDT (XXXVII) behandelt: Der Angriffspunkt dieses Stoffes, dessen p.p'-Isomeres sich am wirksamsten erweist, liegt auf Grund der Lipoidlöslichkeit des Moleküls im Nervensystem der Tiere, wobei hauptsächlich die peripheren Nerven den ersten Angriff auszuhalten haben (17.). Die Giftwirkung des DDT ist eine Kontaktgiftwirkung, die einen Eingriff in die Erregungsübertragung darstellt. Es wurde auch entdeckt, daß ein Teil des in das Gewebe eindiffundierte DDT fest, ein anderer Teil locker gebunden ist, und daß es sich bei dem Typ der Bindung um einen Ladungsübertragungskomplex handeln soll (58.).

DDT ist im Wasser sehr schwer löslich, in einer Reihe organischer Lösungsmittel gut. Es ist gegenüber Oxydationseinflüssen, Licht und Luftsauerstoff weitgehend beständig und besitzt auch einen sehr niedrigen Dampfdruck, was seine Verwendung als Kontaktinsektizid bedingt. Im Insektenkörper wird es durch die entgiftende DDT-Dehydrochlorinase in das nicht insektizide DDE unter HCl-Abspaltung abgebaut. Diese Dehydrochlorinase wird in höherer Konzentration in Insektenarten und -stämmen gefunden, die gegen das Insektizid widerstandsfähig bzw. resistent geworden sind (85.).



XXXVII

Ein weiteres interessantes Insektizid als Beispiel chlorierter Insektizide ist das 1.2.3.4.5.6-Hexachlorcyclohexan (XXXVIII) aus der Gruppe der HCH-Insektizide. Es wirkt als Atem-, Fraß- und Kontaktgift, hat aber auf Grund seines hohen Dampfdruckes eine größere Flüchtigkeit. Kombiniert mit DDT zeigt dieses Gemisch beider Insektizide den bekannten "knock down"-Effekt, d.h. die unmittelbar nach Anwendung einsetzende Niederschlagswirkung auf Insekten, der oft eine über mehrere Wochen anhaltende Wirksamkeit der Beläge der Insektizidmischung gegen neu hinzufliegende Insekten folgt, das auf die anhaltende Wirkungsdauer des DDT zurückgeht.

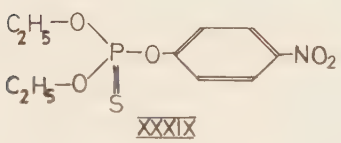
Der Angriffseffekt des Hexachlorcyclohexans, von denen das γ-Isomere (Gammexan; XXXVIII); 76.) das wirksamste ist, äußert sich unter anderem in der Zerstörung der Atmungsorgane, der Tracheen und Tracheolen der Insekten. Als Kontaktgift wird es von der Lipoidschicht der Epicuticula aufgenommen. Der Weg des Giftes in das Innere des Insektenkörpers verläuft nicht durch die verhärtete Cuticula und die Chitinschicht, sondern durch Gelenkspalten, Sinnesorganöffnungen und Stigmen. Die nicht sklerotierten dünnen Intersegmentalhäute werden durchdrungen. Die Vergiftungserscheinungen lassen auf Störungen des Zentralnervensystems schließen: motorische Unruhe, Koordinations- und Gleichgewichtsstörungen und Krämpfe führen zum Tode.

Im ganzen Insektenkörper sind Schädigungen histologisch nachweisbar: Veränderungen der Zellstruktur im Blut, Fettkörpergewebe, in der Nervensubstanz und in den Zellen fast aller Organe. Auch Eingriffe in die Kernteilung der Zellen werden beobachtet (79.).

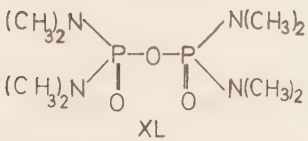
XXXVIII

Eine weitere Gruppe der synthetischen organischen Insektizide ist die der organischen phosphorhaltigen, der Phosphorsäureester, die die Möglichkeiten des Pflanzenschutzes

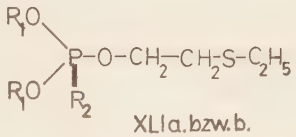
durch ihre vielseitige Wirksamkeit sowohl gegen fressende, als auch gegen saugende Insekten erweitern. Dazu gehört unter anderen das Parathion (E 605, O.O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thionophosphat (XXXIX); 79.), OMPA (Oktamethyl-pyrophosphorsäureamid bzw. Bis-(dimethylamino)-phosphorsäureanhydrid (XL), Systox (Demeton, O.O-Diäthyl-S-(3-thia-pentyl)-monothiophosphat (XLIa) und Metasystox (O.O-Dimethyl-S-(3-thia-pentyl)-monothiophosphat (XLIb); u.a., die als schnell wirkende Kontakt-, Fraß- und Inhalationsgifte vorübergehend das Problem der Resistenz mancher Schädlinge gegen chlorierte Kohlenwasserstoffe löste, bevor auch Resistenzerscheinungen gegen diese Phosphorsäure-Insektizide sich bemerkbar machten.



XXXIX



XL



XLIa.bzw.b.

R_1: C_2H_5—(XLIa), CH_3—(XLIb)

R_2: O(PO-XLI), : S(PS-XLI)

Die Wirkungsweise der phosphorhaltigen Insektizide im Warmblüterorganismus verläuft folgendermaßen: Es ist bekannt, daß der Auf- und Abbau des Acetylcholins entscheidende Bedeutung bei der Erregungsleitung im Nervensystem besitzt, da es in der Reizleitung die Rolle einer Überträgersubstanz spielt; denn es wird freigesetzt: 1. bei der Reizübertragung im vegetativen Nervensystem an den neutralen Synapsen der Ganglienzellen, 2. bei der Vermittlung der Impulse von den Nervenenden des parasympathischen Anteils des vegetativen Nervensystems zum Acceptororgan, 3. bei der Reizleitung im Zentralnervensystem und 4. bei der Erregung der quergestreiften Skelettmuskulatur. Diese Verbindung hat die Aufgabe einer kurzen Vermittlertätigkeit und wird sofort nach der Erfüllung dieser Aufgabe durch das Enzym Cholinesterase gespalten. Wird dieses Enzym in seiner Funktion behindert, so reichert

sich Acetylcholin überall dort an, wo es physiologisch nur in geringen Mengen entsteht. Dadurch ruft es einen erhöhten anhaltenden Reiz auf das zentrale und auf das periphere Nervensystem aus, blockiert die Übergangsstellen und die gesamte Befehlsübermittlung. Die Folge sind exzessive Erregung, später Lähmungen verschiedener Art, wobei Darmtätigkeit, Atmung, Blutdruck und weitere Funktionen gestört werden. Schließlich führt das Versagen des Atmungszentrum im Gehirn zum Tode.

Die Wirkungsweise des Insektizids verläuft nun so, daß in der ersten, rasch verlaufenden Stufe eine Anlagerung des Phosphorsäureesters an das Enzym geschieht, wodurch es blockiert wird. Analog der anderen biologisch aktiven Verbindungen kann vermutet werden, daß das zentrale P-Atom durch die elektronenanziehende Wirkung des doppelt gebundenen O- bzw. S-Atoms und des übrigen Molekülteils so stark positiviert worden ist, daß diese geringe Elektronendichte am P-Atom dieses zu polaren Bindungen befähigt und Addukte mit dem Enzymmolekül bildet. In einem zweiten Schritt entsteht offenbar Dialkylphosphor- bzw. -thiophosphorsäure, die das Enzymmolekül phosphoryliert. Von der Beständigkeit der hierbei gebildeten Verbindung ist weitgehend die Dauer bis zur Reaktivierung des Enzyms abhängig. Die Komplexe zerfallen wieder in das Enzym und die Säure, die wasserlöslich ist und ausgeschieden wird (62.).

Die Reaktivierungsgeschwindigkeit des Enzyms zählt zu den Faktoren, die Toxizität des Cholinesterase-Hemmstoffes zu bestimmen. Auch das Ausmaß der Neubildung von Enzymen ist besonders dann von Bedeutung, wenn es sich um irreversible Hemmungen handelt. Der Vergiftungsprozeß beim Insekt unterscheidet sich im Prinzip nicht von dem bei Warmblütern gemachten Feststellungen, da die Übertragung nervöser Impulse in gleicher Weise an das Zusammenspiel von Cholinester und Cholinesterase gekoppelt ist.

Eine Reihe dieser Phosphorsäureester, wie OMPA, Systox, Metasystox u.a. ermöglichen auch eine neuartige Methode der Schädlingsbekämpfung. Im Gegensatz zu Parathion u.a.,

die nur in die Blätter der Pflanzen eindringen und eine gewisse Tiefenwirkung zeigen, dringen diese rasch in den Nährstoff- und Flüssigkeitsstrom der Pflanze ein, verbreiten sich in sämtliche Teile der Pflanze und verschwinden von der Oberfläche der Blätter. Dadurch wird eine selektive Wirkung gegen saugende Insekten und Schädlinge erzielt und eine größere Schonung der Nutzinsekten, wie Bienen, erreicht. Die Aufnahme dieser Insektizide kann auch durch die Wurzeln vom Erdboden her erfolgen, indem das Insektizid vorher in gelöster Form in den Boden gebracht wird. Diese Insektizide werden Systeminsektizide genannt (79.).

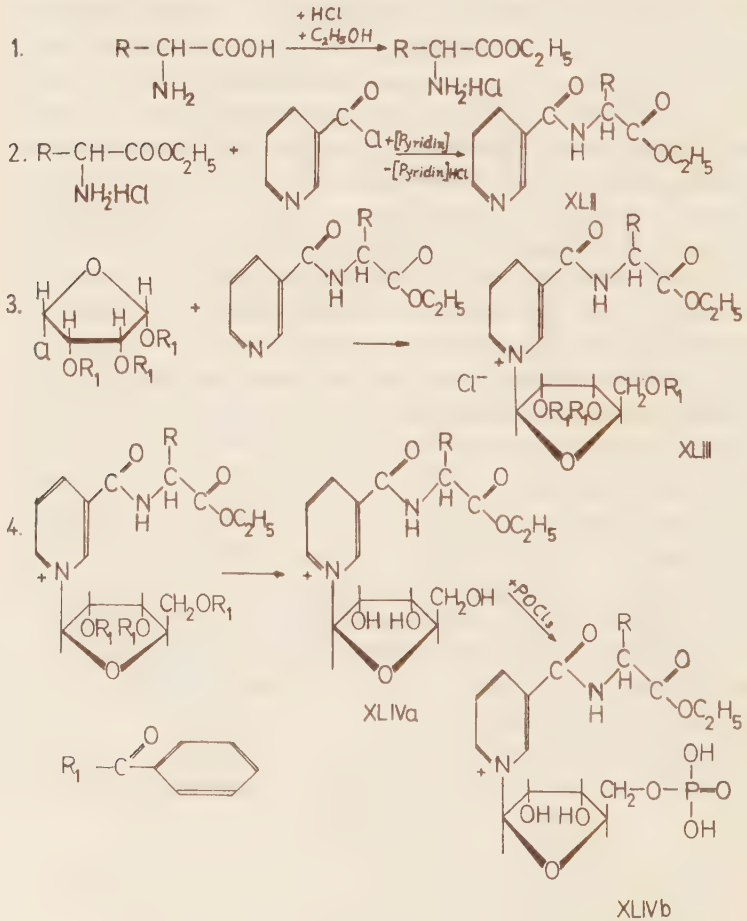
Ester der Carbaminosäure sind gleichfalls Hemmstoffe des Enzyms Cholinesterase und zeigen die gleiche Wirkung. Interessant sind auch organische Fluorverbindungen. Bei der Anwendung des Methylals des ß-Fluoräthylalkohols als Reblaus-Bekämpfungsmittel wurde die wichtige Entdeckung gemacht, daß der Rebstock die Verbindung auch aus der Spritzflüssigkeit durch die Blätter aufzunehmen vermag und diese dann mit der Nährflüssigkeit bis zu den Wurzeln transportiert. Dort werden dann die saugenden Parasiten getötet. Hochwirksam sind als systemische Insektizide auch Fluoressigsäure und deren Salze. Diese fluorhaltigen Verbindungen sind aber so stark toxisch auch gegen Warmblüter, daß sie als Handelspräparate keine Einführung finden.

Diese kurze Übersicht über die Wirkungsweise von Chemosterilantien und Insektiziden wurde aus diesem Grunde gegeben, um neue Erkenntnisse über die Problemstellung selbst, den Unterschied zwischen Chemosterilantien, deren Wirkungsweise und Eingriffe in die Reaktionen der Zelle zu beleuchten, und den Insektiziden und deren Wirkung auf enzymatische Reaktionen der Zellen, die von diesen Giftstoffen gehemmt werden, zu zeigen.

5. Allgemeiner experimenteller Teil

5.1. Einleitung zum experimentellen Teil

Im Rahmen der oben genannten Problemstellung werden als Hauptteil der Arbeit Nicotinylaminosäureester (XLII) und mit benzoylierten Kohlenhydraten gekuppelte Nicotinylaminosäureester (benzoylierte Nucleosid-Derivate (XLIII) als Komponenten für NAD-Analoge nach folgendem Formelschema angestrebt:



Die benzoylierten Nucleosid-Derivate können weiter durch Debenzoylierung, Phosphorylierung und Kupplung mit dem Adenosin-Teil zu NAD-Analogen weiterverarbeitet werden. Diese Versuche wurden versuchsweise bis zur Phosphorylierung (XLIVa-b) durchgeführt, aber auf Grund der Tatsachen eingestellt, daß die Substanzen nicht rein erhalten werden konnten, da sie sich leicht zersetzen.

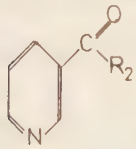
Zur Synthese dieser benzoylierten Nucleosid-Derivate wurde folgender Weg eingeschlagen:

1. Darstellung der Ausgangsprodukte:
   a) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose;
      1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose;
      1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose.
   b) Chlorierung der Kohlenhydrat-Komponenten zur Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate:
      1-Chlor-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose;
      1-Chlor-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose;
      1-Chlor-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose.
2. Darstellung der Nicotinylaminosäureester:
   Nicotinylglycin-(XLVa), -alanin-(XLVb), -methionin-(XLVc), -S-benzyl-L-cystein-(XLVd), -tryptophan-(XLVe), -tyrosinäthylester (XLVf), -glutaminsäure-diäthylester (XLVg) und Di-[Nicotinyl]-lysinäthylester (XLVh) aus Nicotinylchlorid und den entsprechenden Aminosäureäthylestern.
3. Kupplung der chlorierten Kohlenhydratderivaten mit den unter 2. dargestellten Nicotinylaminosäureestern zu den entsprechenden benzoylierten Nucleosid-Derivaten des oben formulierten Typs (XLVI):
   a) N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylaminosäureäthylester-N^1-chlorid (XLVIa-h);
   b) N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (XLVII);
   c) N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (XLVIII).

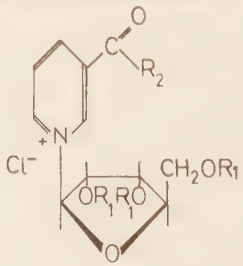
4. Versuche zur Darstellung weiterer Stufen

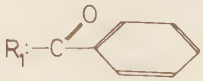
a) Abspaltung der Benzoylgruppe eines benzoylierten Nucleosid-Derivats:
Von der Verbindung N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid wurde versucht, die Benzoylgruppen in ammoniakalischer Methanollösung abzuspalten. Das erwartete Produkt N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (XLIVa) enthält nach den analytischen Ergebnissen bei Anwendung der 1. Vorschrift zuviel Stickstoff, dagegen ist nach der 2. Vorschrift der Stickstoffüberschuß wesentlich geringer. Eine Rebenzoylierung des nach der 2. Vorschrift erhaltenen Produkts führte zum benzoylierten Ausgangsprodukt zurück, das aber nach der Analyse fast kein Chlor enthält.

b) Versuche zur Phosphorylierung des debenzoylierten Nucleosid-Derivats zum Nicotinylglycinäthylester-Mononucleotid N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -glycinäthylester-5'-phosphat (XLIV b):
Die Phosphorylierung des N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -glycinäthylester-N^1-chlorid zum obigen Mononucleotid-Derivat geschah mit $POCl_3$ analog einer Vorschrift von N.H. Hughes u.a. (35.) und mit Cyanäthylphosphat nach Ch. Woenckhaus u.a. (102.). Sie ergab in beiden Fällen ein braunes Endprodukt von schmieriger Beschaffenheit und ohne definierbaren Schmelzpunkt mit unmöglicher Analyse. Weitere Versuche in diese Richtung wurden wegen oben genannter Gründe eingestellt.



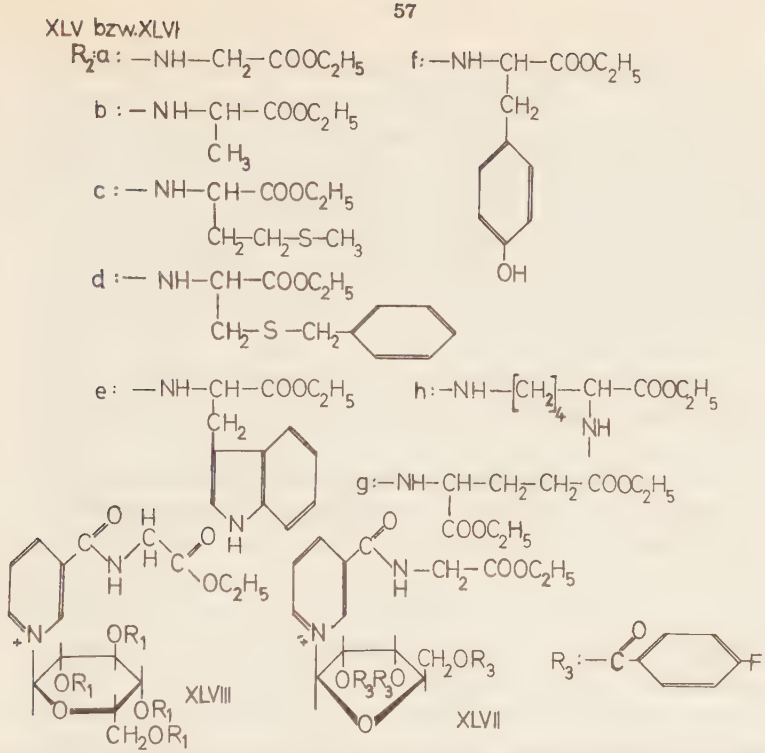
XLV





R_2 :-Aminosäureester

XLVI



Bei der Darstellung der benötigten Ausgangsprodukte, die auch als Vorprodukte bezeichnet werden, konnte man nur im Falle der Kohlenhydrat-Komponenten auf die Literatur zurückgreifen (46.).

Die Vorschriften zur Darstellung der Nicotinylaminosäureäthylester dagegen wurden neu entwickelt und führten zu keinerlei Schwierigkeiten bei der Durchführung der Synthese. Zur Darstellung der mit benzoyliertem Kohlenhydrat gekuppelten Nicotinylaminosäureäthylester, kurz auch benzoylierte Nucleosid-Derivate genannt, ist zu sagen, daß die Kondensation der Komponenten zunächst einfach erschien, da in der Literatur ähnliche Synthesen zur Darstellung des reinen unsubstituierten Nucleosids beschrieben worden sind, aber die ersten Vorversuche ließen schon erkennen, daß durch das Auftreten beträchtlicher Schwierigkeiten zeitraubende Vorversuche notwendig sein werden, um die gewünschten benzoylierten Nucleosid-Derivate zu bekommen. Es wurde daher für jedes benzoylierte Nucleosid-Derivat eine größere An-

zahl Vorversuche durchgeführt, die im speziellen experimentellen Teil näher beschrieben werden. Bei den Vorversuchen zur Kondensation der Komponenten (Nicotinylaminosäureäthylester und chlorierte Kohlenhydrat-Derivate) wurden die Reaktionsbedingungen folgendermaßen verändert: 1. Molverhältnis der Reaktionspartner; 2. die Menge der Lösungsmittel für die Reaktionspartner; 3. die Reihenfolge des Zusammengebens der Reaktionspartner und 4. die Dauer der Reaktion in dem Kühlraum.

Für die einzelnen Verbindungen mußte auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften der gekuppelten Nicotinylaminosäureester jedesmal die endgültige Vorschrift in vielen Vorversuchen mit dem Ziel der besten Analysenergebnisse, der höchsten Ausbeuten und eines genauen Schmelzpunktes ermittelt werden.

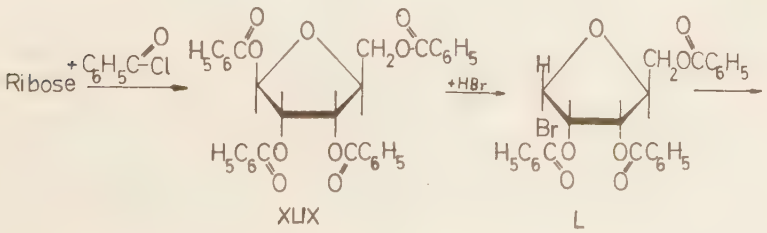
Als Beispiel gaben die Vorversuche zur Darstellung des benzoylierten Nucleosid-Derivats N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid zunächst nur eine Fraktion des gewünschten Produkts, die in Essigester unlösliche Fraktion I, welche aber durch Analyse als Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid erkannt wurde. Erst danach wurde auch die Fraktion II gewonnen, der in Essigester lösliche Teil, der nach entsprechender Variierung der Reaktionsbedingungen zu einem günstigen Analysenergebnis führte, und damit als das gewünschte Produkt angesehen werden kann. In einigen wenigen Fällen verschiebt sich die Fraktionsnummerierung: Es ist dann Fraktion I, der in der Chloroformlösung, worin der eingedampfte Rückstand zuerst gelöst wird (s. Vorschrift), unlösliche Teil, Fraktion II, der in Essigester unlösliche Teil und Fraktion III, der in Essigester lösliche Teil.

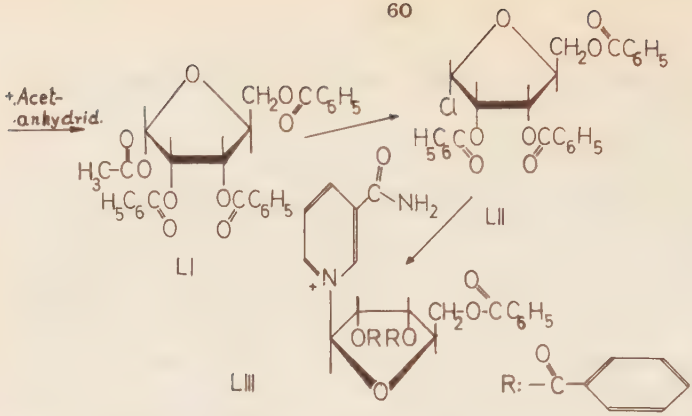
Die endgültigen Vorschriften für die Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate werden aus den Vorversuchen mit den besten Analysenergebnissen nach dem Kapitel über die analytischen Untersuchungen herausgenommen und an den Anfang der Synthesevorschriften gesetzt.

5.2. Allgemeine Ausführungen über die Synthesewege

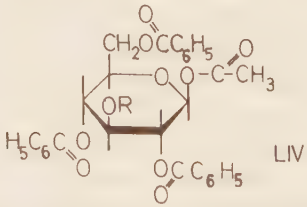
5.2.1. Synthese der 1-Chlor-Kohlenhydrat-Derivate

Das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) enthält im Nicotinamid- und Adeninteil des Moleküls als Zuckerkomponente die D-(-)-Ribose, die wie alle Pentosen in der Ringform an den Kohlenstoffatomen 1, 2, 3 und 5 je eine freie Hydroxylgruppe enthalten. Im weiteren Verlaufe der Synthese würden diese im ungeschützten Zustande mit dem Chlorwasserstoff, welcher im Äther gelöst ist, zu einem mehrfach chlorierten Zucker reagieren und somit eine Verbindung ergeben, die nicht erwünscht ist, denn es soll nur das C-1-Atom chloriert werden. Zu diesem Zwecke werden zuerst alle OH-Gruppen des Ribosemoleküls einschließlich der glykosidischen OH-Gruppe am C-1-Atom durch Reaktion mit der entsprechenden Menge Benzoylchlorid mit einer Schutzgruppe, der Benzoylgruppe, versehen (XLIX). Anschließend erfolgt eine Abspaltung der gesamten O-Benzoylgruppe am C-1-Atom durch HBr in konzentrierter Essigsäure (Eisessig), wobei diese Reaktion durch die leichte Reaktionsfähigkeit von aktiven Gruppen am C-1-Atom der Zucker begünstigt wird. Die benzoylierte 1-Brom-Ribose (L) wird dann durch Umsetzung mit Acetanhydrid in die 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LI) umgewandelt, das als vorläufiges Endprodukt nach dem Umkristallisieren erhalten wird. Für die Reaktion mit den Nicotinylaminosäureäthylestern wird diese durch Lösen in kaltem, mit HCl-Gas gesättigtem Äther in die 1-Chlor-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LII) umgewandelt, die sofort ohne weitere Isolierung mit dem Ester zur Reaktion gebracht wird (LIII).





Analog verläuft die Reaktion mit p-Fluorbenzoylchlorid, welche das Produkt 1-O-Acetyl-2.3.5-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose ergibt. Beide Produkte sind feinkristallin, farblos und haben einengenauen Schmelzpunkt und ergeben gute Analysenergebnisse. Dagegen führen die Reaktionen der Glucose mit den entsprechenden Reagenzien zur 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose (LIV), das ein sirupartiges Produkt von dunkler Farbe und mit Wassergehalt ist und dessen Analysenergebnisse mit den berechneten übereinstimmen.



5.2.2. Darstellung der Nicotinylaminosäureester

Zur Darstellung der Nicotinylaminosäureester wird analog einem abgewandelten Verfahren nach E. Späth (33.) zur Darstellung von Nicotinylglycinäthylester gearbeitet.

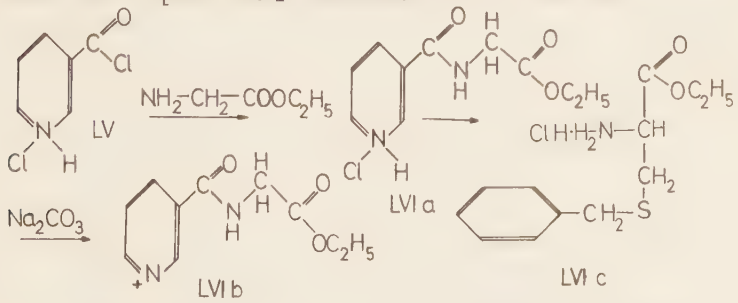
Nicotinsäure wird zunächst mit Thionylchlorid in das Nicotinylchlorid-hydrochlorid (LV) überführt. Diese reagiert dann mit Glycinäthylester-hydrochlorid in Chloroformlösung unter Einwirkung einer berechneten Menge Triäthylamin zum Nicotinylglycinäthylester-hydrochlorid (LVIa), das dann mit Na_2CO_3-Lösung in einem zweiten Arbeitsgang hydrolysiert wird (LVIb).

In dieser Arbeit wird Pyridin als basisches Reaktionsmittel verwendet und gleich nach der Reaktion in einem Arbeitsgang die Lösung mit einer gesättigten Sodalösung ausgeschüttelt, so daß sofort der reine Nicotinylglycinäthylester gewonnen wurde, der dann mehrmals mit Wasser geschüttelt, dann eingedampft, mit Toluol destilliert, nochmals mit Chloroform gelöst und mit Wasser geschüttelt wurde, um ein reines Produkt zu erhalten. Das Produkt kristallisiert strahlenförmig aus und ist von schwach gelblicher Färbung. Es besitzt einen genauen Schmelzpunkt.

Die anderen Nicotinylaminosäureäthylester wurden analog dargestellt. Die gefundenen Analysenwerte stimmen gut mit den berechneten überein. Nicotinylglutaminsäurediäthylester ist ein öliges, dickflüssiges Produkt.

Es wurden auf diese Weise dargestellt:

Nicotinylglycin-,-alanin-,-methionin-, -S-benzyl-L-cystein-, -tryptophan-, -tyrosin-äthylester, -glutaminsäurediäthylester und Di-[nicotinyl]-lysinäthylester (Tabelle 3).



Für die Verwendung von Cystein als S-haltige Aminosäure bei der Kupplung mit Nicotinylchlorid-hydrochlorid zur Darstellung der Nicotinylaminosäureäthylester muß die bei der Reduktion des Cystins entstehende SH-Gruppe durch eine Schutzgruppe, in diesem Falle durch eine Benzylgruppe, geschützt werden. Es wird eine Vorschrift von Harington und Rivers (32.) verwendet, in der das Cystin in flüssigem NH_3 durch gelöstes metallisches Na reduziert und anschließend durch Zutropfen von Benzylchlorid zur Reaktion gebracht wird. Das S-Benzyl-L-cystein wird anschließend mit Äthanol/HCl in das

Tabelle 3: Darstellung der Nicotinylaminosäureäthylester

As.	Brutto-formel	Nicotinyl-chlorid HCl		Aminosäu-reester		Ausbeute		Schmp.	Analyse					
									C		H		N	
		g	Mol	g	Mol	g	%	°C	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
1.	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	8,9	0,05	7,1	0,05	5,7	54,7	53-55	57,6	57,68	5,9	5,89	13,3	13,45
2.	$C_{11}H_{14}N_2O_3$	8,9	0,05	7,8	0,05	4,5	40,5	48-50	58,7	59,45	6,3	6,35	12,7	12,59
3.	$C_{13}H_{18}N_2O_3S$	8,9	0,05	11,4	0,05	3,5	24,0	57-60	54,0	53,58	6,7	6,57	9,8	9,61
4.	$C_{15}H_{20}N_2O_5$	8,9	0,05	12,0	0,05	12,0	73,5	Oel	54,0	55,20	6,3	6,79	8,3	8,58
5.	$C_{19}H_{19}N_3O_3$	8,9	0,05	13,7	0,05	11,5	68,1	123-124	67,8	67,64	5,9	5,67	11,6	12,46
6.	$C_{20}H_{24}N_4O_4$	8,9	0,05	6,2	0,025	4,2	43,8	57-60	62,2	62,50	6,6	6,29	13,8	14,58
7.	$C_{18}H_{20}N_2O_3S$	8,9	0,05	13,8	0,05	13,0	75,2	118-119	62,2	62,76	6,2	5,85	7,4	8,13
8.	$C_{17}H_{18}N_2O_4$	8,9	0,05	12,3	0,05	11,5	73,5	143-144	63,7	64,95	5,7	5,77	8,6	8,91

As. = Aminosäure: 1. Glycin; 2. DL-Alanin; 3. DL-Methionin; 4. L-(+)-Glutaminsäure; 5. DL-Tryptophan; 6. DL-Lysin; 7. S-Benzyl-L-cystein; 8. L-Tyrosin

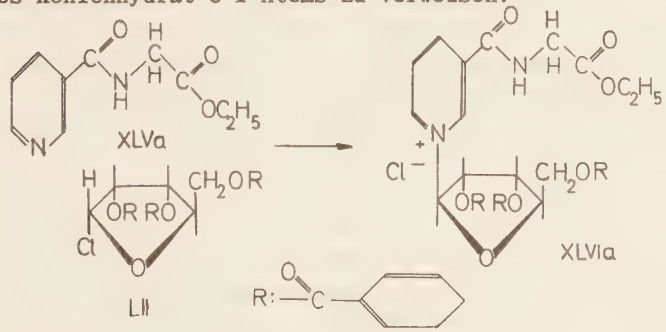
S-Benzyl-L-cysteinäthylester-hydrochlorid umgewandelt, welches als farbloses, kristallines Pulver mit genauem Schmelzpunkt gewonnen wird (LVIc).

5.2.3. Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate

Die Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate, Vorstufen der NAD-Analoge, deren Carbonylgruppe am C-3-Atom des Pyridinringes mit einer Aminosäureestergruppe substituiert ist, wird nach folgenden Wegen analog der Vorschriften von L. Haynes und J. Davoll u.a. (15.,33.) durchgeführt:

Am Beispiel des benzoylierten Nucleosids N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1 -chlorids (XLVIa) wird der Syntheseweg kurz erläutert:

Die Darstellung des Glycin-Derivats erfolgt durch eine Reaktion des N-Atoms des Pyridinringes mit dem C-1-Atom der Ribose, wobei das einsame Elektronenpaar des N-Atoms mit der Elektronenlücke des C-1-Atoms der Ribose, die nach Abspaltung des Cl-Ions entstanden war, eine Bindung eingeht. Hierbei ist auf die besonders leichte Reaktionsfähigkeit des Kohlenhydrat-C-1-Atoms zu verweisen.



1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LI) wurde in mit HCl-Gas gesättigtem Äther gelöst und durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank in das 2.3.5-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosylchlorid bzw. 1-Chlor-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LII) überführt. Nach Ablauf der Zeit wird die Re-

aktionslösung von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft bis zu einem dicken Sirup, der noch zusätzlich mit Benzol behandelt wird, das gleichfalls abdestilliert wird. Der sirupartige Rückstand wird dann in einer bestimmten Menge Acetonitril gelöst und mit dem Nicotinylglycinäthylester, ebenfalls in einer bestimmten Menge Acetonitril gelöst, ohne weitere Aufarbeitung in der Kälte zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung bleibt mehrere Tage im Kühlschrank und wird nach dem Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen bei Zimmertemperatur eingedampft.

Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen. Dabei bleibt bei einigen Ansätzen ein Teil des Rückstandes ungelöst zurück, der in diesem Falle als Fraktion I gekennzeichnet wird. Dieser wird abfiltriert. Die Chloroformlösung wird danach im Kühlschrank abgekühlt und mit Äther überschichtet. Es fiel eine ölige, teils amorphe Suspension bzw. ein Niederschlag aus, der auch anschließend teilweise kristallin wird. Weiteres Überschichten mit Äther und vorsichtiges Umrühren führt zu einer Vermehrung des Niederschlages, solange bis nach weiterer Ätherzugabe keiner mehr ausfällt. Der schmierige Niederschlag setzt sich ab. Danach wird die Äther-Chloroform-Lösung vorsichtig abdekantiert und der Rückstand mit Äther nachdekantiert. Anschließend wird der Niederschlag mit Essigsäureäthylester (Essigester) behandelt, worin er sich je nach dem Derivat mehr oder weniger unvollständig löst. Durch unvollständiges Lösen des Produkts in Essigester erhält man als Rückstand die Fraktion I, der in Essigester ungelöste Teil (Fraktion II, wenn ein Teil des Reaktionsproduktes sich nicht in Chloroform löst). Der in Essigester lösliche Teil wird nach dem Abkühlen der Lösung im Kühlschrank und Überschichten dieser mit Äther als Fraktion II ausgefällt (Fraktion III, wenn die vorhergehende die in Essigester unlösliche ist). Er wird dann mit Äther gewaschen nach dem Absaugen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Für die Durchführung der Synthesen der angeführten Derivate N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl-

glycin-, -alanin-, -methionin-, -S-benzyl-L-cystein-, -tryptophan-, -tyrosin-äthylester-N^1-chlorid, -glutaminsäure-diäthylester-N^1-chlorid, Di-{N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl}-lysinäthylester-di-N^1-chlorid, N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid und N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid werden in Vorversuchen die Reaktionsbedingungen verändert, und zwar die Reaktionsdauer, die Menge an Lösungsmitteln, die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Komponenten und auch das Molverhältnis der Komponenten zueinander. Aus diesen Vorschriften der Vorversuche wurden dann die gültigen Vorschriften für die benzoylierten Nucleosid-Derivate ermittelt.

Die benzoylierten Nucleosid-Derivate der Fraktion II bzw. III sind angeführt in den Tabellen: 20, 21, 23, 25, 26, 29 und 30, die Fraktion I in den übrigen Tabellen des Kapitels 8.3.2. (Tab. 19-30, S. 248 - 270)

5.3. Untersuchungen zur Konstitutionsbestimmung

Nach den allgemeinen Ausführungen über die Synthesewege folgt zunächst ein Abschnitt in der Arbeit, in dem die Untersuchungen zur Konstitutionsbestimmung der hergestellten Produkte behandelt und die Ergebnisse dieser Untersuchungen tabellarisch wiedergegeben bzw. diskutiert werden.

Es werden folgende synthetisierte Produkte untersucht:

1.) Die Nicotinylaminosäureester: Nicotinylglycinäthylester (abgekürzt: Nic.gly.est.), -alaninäthylester (Nic.ala.est.), -methioninäthylester (Nic.met.est.), -S-benzyl-L-cysteinäthylester (Nic.S-bzl.cys.est.), -tryptophanäthylester (Nic.tryp.est.), -tyrosinäthylester (Nic.tyr.est.), -glutaminsäurediäthylester (Nic.glu.est.) und Di-[Nicotinyl]-lysinäthylester (Di-Nic.lys.est.);

2.) Die benzoylierten Nucleosid-Derivate: N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl-glycinäthylester-N^1-chlorid (abgekürzt: Nic.gly.rib.),

-alaninäthylester-N^1-chlorid (Nic.ala.rib.), -methioninäthylester-N^1-chlorid (Nic.met.rib.), -S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid (Nic.S-bzl.cys.rib.), -glutaminsäure-diäthylester-N^1-chlorid (Nic.glu.rib.), -tryptophanäthylester-N^1-chlorid (Nic.tryp.rib.), -tyrosinäthylester-N^1-chlorid (Nic.tyr.rib.), Di-{N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl}-lysinäthylester-di-N^1-chlorid (Di-Nic.lys.rib.), N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.pF-rib.), N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.gluc) und das versuchsweise debenzoylierte Produkt N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Deb. Nic.gly.rib.) und das rebenzoylierte Produkt N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester (Reb.Nic.gly.rib.).

a) Folgende einfache analytische Untersuchungsmethoden werden angewandt:

1.) Die Elementaranalyse zur Bestimmung des Kohlenstoff-, des Wasserstoff- und des Stickstoffgehalts und zum Teil, soweit es möglich war, des Halogen- (Cl- oder F-) Gehalts und des Schwefelgehalts. Von den Nicotinylaminosäureestern wurden nur der Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalt bestimmt.

2.) Die qualitativ-analytische Bestimmung der benzoylierten Nucleosid-Derivate auf den Kohlenhydrat-Gehalt mittels a) der Molisch-Probe, b) der Tollens-Probe und c) der Seliwanow-Probe.

3.) Die quantitativ-analytische Bestimmung der benzoylierten Nucleosid-Derivate auf abspaltbare Benzoyl- und andere funktionelle Gruppen und auf den Chlorid-Gehalt.

b) Folgende spezielle analytische Untersuchungsmethoden:

1.) Spektralanalytische Untersuchungen der benzoylierten Nucleosid-Derivate und der ausgewählten und

gut kristallisierten Nicotinylaminosäureester: Nicotinylglycinäthylester, -methionin-, -S-benzyl-L-cystein-, -tryptophan-, -tyrosin- und Di-[Nicotinyl]-lysinäthylester mittels Infrarotspektroskopie.

2.) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der benzoylierten Nucleosid-Derivate und der ausgewählten, unter 1.) angegebenen Nicotinylaminosäureester.

3.) Molgewichtsbestimmung der benzoylierten Nucleosid-Derivate.

Das debenzoylierte Produkt Deb.Nic.gly.rib. und das rebenzoylierte Reb.Nic.gly.rib. wurden zum Teil und zum Vergleich in die Untersuchungen mit einbezogen.

5.3.1. Analytische Untersuchungen der Nicotinylaminosäureester

Die oben angegebenen Nicotinylaminosäureester wurden nur der Elementaranalyse unterzogen. Da die Ergebnisse der Elementaranalyse (Tab. 3) eindeutig, und da einige von diesen Verbindungen (Nic.ala.est., Nic.gly.est.) bekannt sind, wurden nur die angeführten Verbindungen, soweit es möglich war, zusätzlich IR-spektralanalytisch und dünnschichtchromatographisch untersucht.

5.3.2. Analytische Untersuchungen der benzoylierten Nucleosid-Derivate

Die oben angegebenen Nucleosid-Derivate wurden folgenden analytischen Untersuchungen unterworfen:

1.) der Elementaranalyse;

2.) der qualitativ-analytischen Bestimmung auf die Kohlenhydrat-Gruppe und auf Chlorid-Ionen;

3.) der quantitativ-analytischen Bestimmung auf abspaltbare Benzoyl- und andere funktionelle Gruppen und auf den Chlorgehalt.

Zu 1.) Durch die Elementaranalyse wurden der Kohlenstoff-,

Wasserstoff-, Stickstoff-, zum Teil der Halogen- (Chlor- und Fluor-) und der Schwefel-Gehalt bestimmt und in den Tabellen 4 und 5 wiedergegeben. Von den Hauptversuchsansätzen, die in den endgültigen Vorschriften beschrieben werden, stimmen die gefundenen Werte mit den berechneten in der Mehrzahl überein. Abweichungen von den berechneten Werten zeigen die benzoylierten Nucleosid-Derivate der Aminosäuren Alanin (Nic.ala.rib.), S-Benzyl-L-cystein (Nic. S-bzl.cyst.rib.), Tyrosin (Nic.tyr.rib.) und Lysin (Di-Nic. lys.rib.), welche in der Tabelle 5 zu erkennen sind. Die Ursachen liegen darin, daß sich außer den benzoylierten Nucleosid-Derivaten Nicotinylaminosäureäthylester-N^1-hydrochloride gebildet haben, die trotz Reinigungsversuche der Reaktionsprodukte nicht abgetrennt werden konnten und daher die Analysenergebnisse negativ beeinflussen. Die analytischen Werte dieser Hydrochloride sind in der Tabelle mit aufgeführt. Der höhere Stickstoffgehalt der debenzoylierten Verbindung Deb.Nic.gly.rib. ist offenbar auf die Bildung von NH_4Cl zurückzuführen. Die Behandlung einer Probe mit kalter 10%iger NaOH führte zum Entweichen von NH_3, das mit pH-Papier und geruchlich nachgewiesen wurde.

Zu 2.) Zur qualitativ-analytischen Bestimmung wurden drei Proben auf Kohlenhydrate und eine auf Chloridionen durchgeführt:

a) die Molisch-Probe: 1 ml der Nucleosid-Lösung werden mit 5 Tropfen 2%iger α-Naphthol/Äthanol-Lösung versetzt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. An der Grenzfläche Säure/Lösung entsteht ein blauer Ring eines Farbstoffes aus Furfural bzw. Furfural-Derivat, gebildet durch Wasserabspaltung des Kohlenhydratringes, und α-Naphthol. Diese Probe dient als allgemeiner Kohlenhydratnachweis.

b) die Tollens-Probe: 1 ml der Analysenlösung werden mit 1 ml Tollens-Reagenz versetzt, die aus einer 0,5%igen Lösung von Orcin in konzentrierter HCl besteht, und anschließend einige Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Bei Pentosen färbt sich die Lösung blau. Sie dient speziell zum Nachweis von Pen-

Tabelle 4: Analytische Nachweise der N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl-aminosäureäthylester-N^1-chloride (reine Substanzen)

As.	Ans. Fraktion Nr.	Bruttoformel	Molgewicht		Analyse der Elemente							
					C		H		N		Halogene	
			ber.	gef.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
1.	30/I	$C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	707,15	690	61,40	61,15	5,70	4,99	4,10	3,96	-	-
1.	40/I	$C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	707,15		61,18	61,15	5,04	4,99	4,09	3,96	-	-
2.	12/I	$C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$	799,31	677	57,30	58,60	5,70	5,42	4,50	3,50	-	-
3.	9/I	$C_{41}H_{41}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$	807,27	688	59,40	61,00	5,52	5,37	3,80	3,47	5,40	4,34
4.	5/II	$C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$	836,31	752	64,40	64,63	5,50	5,06	6,30	5,02	-	-
		N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid										
1.	3/I	$C_{44}H_{39}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$	841,29	802	63,10	62,82	5,10	4,91	3,20	3,33	-	-
		N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid										
1.	2/II	$C_{36}H_{30}ClF_3N_2O_{10} \cdot 1H_2O$	761,13	750	57,21	56,81	4,18	4,24	4,04	3,68	6,63 (F-Werte)	7,49

As. = Aminosäure: 1. Glycin; 2. Methionin; 3. Glutaminsäure; 4. Tryptophan

Tabelle 5: Analytische Nachweise der N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylaminosäureäthylester-N^1-chloride (unreine Produkte)

As.	Ans. Fraktion Nr.	Bruttoformel	Molgewicht		Analyse der Elemente							
					C		H		N		S	
			ber.	gef.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
1.	15/I	$C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	721,18	540	57,40	61,62	5,50	5,17	-	-	-	-
2.	4/I	$C_{44}H_{41}N_2O_{10}ClS \cdot 1H_2O$	843,37	584	59,10	62,67	5,46	5,14	4,91	3,32	5,53	3,80
3.	2/I	$C_{43}H_{39}ClN_2O_{11} \cdot 1H_2O$	813,28	800	58,27	63,51	5,12	5,08	4,89	3,44	-	-
4.	1/I	$C_{72}H_{66}Cl_2N_4O_{18} \cdot 1H_2O$	1364,29	875	59,90	63,40	5,50	5,03	5,80	4,11	-	-
		Nicotinylaminosäureäthylester-N^1-hydrochlorid als Vergleich:										
1.	15/I	$C_{11}H_{15}ClN_2O_3$	258,71		57,40	51,07	5,50	5,85	-	-	-	-
2.	4/I	$C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$	380,90		59,10	56,76	5,46	5,55	4,91	7,35	5,35	8,42
3.	2/I	$C_{17}H_{19}ClN_2O_4$	350,81		58,27	58,20	5,12	5,46	4,89	7,98	-	-
4.	1/I	$C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_4$	457,37		59,90	52,52	5,50	5,73	5,80	12,25	-	-

As. = Aminosäure: 1. Alanin; 2. S-Benzyl-L-cystein; 3. Tyrosin; 4. Lysin

tosen.

c) die Seliwanow-Probe: 1 ml der Analysenlösung werden mit einer 0,5%igen Lösung von Resorcin in konzentrierter HCl (1ml) versetzt und zum Sieden erhitzt. Dabei entsteht eine Rotfärbung, die sich bei Ketohexosen besonders schnell bildet.

Die Färbungen der letzten beiden Proben entstehen durch Bildung von Farbstoffen aus dem durch HCl-Einwirkung auf Kohlenhydrate gebildeten Furfural bzw. Furfural-Derivaten und dem entsprechenden Orcin bzw. Resorcin.

Bei den vorliegenden, zu analysierenden Verbindungen, in denen die Kohlenhydrate einmal durch Nicotinylaminosäureäthylester und durch Benzoylgruppen substituiert sind, verzögerte sich bei der Molisch-Probe die Bildung des blauen Ringes. Er ist auch schwächer als der von reinen Kohlenhydrat-Analysen. Zu den anderen Proben ist festzustellen, daß die Blaufärbung der Lösung bei der Tollens-Reaktion selten auftritt, eher kurzzeitig. Es tritt eher eine grün-gelbliche Färbung auf. Offenbar wird die Reaktion durch die Substituenten gestört. Nur die Verbindungen Nic.gly.rib., Nic.ala.rib., Nic.met.rib., Nic.tryp.rib. und Deb.Nic.gly.rib. zeigen eine schwache bläuliche Färbung der Lösung, die nur kurze Zeit bestehen bleibt. Die Seliwanow-Reaktion kommt in allen Verbindungen deutlicher zur Erscheinung, aber weniger stark ausgeprägt als von reinen Kohlenhydraten.

In der Tabelle 6 sind von den angegebenen Analysenprodukten die Stärkegrade der Nachweisreaktionen durch ein bis drei +-Zeichen wiedergegeben. Kurzzeitig + heißt, daß die Farbreaktionen nur wenige Minuten sichtbar war.

d) Die Reaktion auf Chloridionen wurde mit einer HNO_3-haltigen $AgNO_3$-Lösung durchgeführt, die bei allen Produkten positiv ausfiel.

Tabelle 6: Qualitativ-analytische Untersuchungen

Verbindungen (abgekürzt)	Molisch-Probe	Tollens-Probe	Seliwanow-Probe	Chloridionen-Best. mit $AgNO_3$
Nic.gly.rib.	+ +	k +	+	+
Nic.ala.rib.	+	k +	+	+
Nic.met.rib.	+ +	k +	+	+
Nic.S-bzl. cyst.rib.	+	-	+	+
Nic.glu.rib.	+	-	+	+
Nic.tryp.rib.	+	+	+ + +	+
Nic.tyr.rib.	+	-	+ +	+
Di.Nic.lys.rib.	+ + +	-	+ +	+
Nic.gly.pF-rib.	+ +	-	+ + +	+
Nic.gly.gluc.	+ +	-	+ +	+
Deb.Nic.gly.rib.	+ + +	+	+ +	+

Zeichenerklärung:

- \- = negativ, keine Blaufärbung bei der Tollens-Probe
- k + = kurzzeitig schwach positiv
- \+ = schwache positive Reaktion, schwache Färbungen bzw. schwacher blauer Ring
- ++ = mittelstarke Reaktion, stärker sichtbare Färbung der Lösungen bzw. blauer Ring
- +++ = starke Reaktion, starke sichtbare Färbung bzw. stark gefärbter blauer Ring

Analytische Untersuchungen des rebenzoylierten N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester (Reb.Nic.gly.rib.):

Zum Beweis der durch NH_3 in methanolischer Lösung abgespaltenen Benzoylgruppen des Nic.gly.rib. erhaltenen debenzoylierten N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Deb.Nic.gly.rib.) wurde diese Verbindung einer Rebenzoylierung mit Benzoylchlorid zu Reb Nic.gly.rib. un-

terworfen. Das erhaltene Produkt wurde anschließend analytisch untersucht. Die Proben auf Kohlenhydrate verliefen positiv und ähnelten denen der normalen Nic.gly.rib.-Ausgangsprodukte. Die Molisch-Probe ergab einen schwachen blauen Farbring, die Tollens- und die Seliwanow-Probe ergaben wie beim Nic.gly.rib. nur geringe Färbungen der Lösungen. Die qualitative Chlorid-Bestimmung war schwach positiv und die Zahl der erfaßbaren, abspaltbaren Gruppen am Molekül betrug 3. Die quantitative Chlor d-Bestimmung konnte wegen geringer Reaktion nicht durchgeführt werden. Wahrscheinlich fehlt der größte Teil des Chloridgehalts.

Zu 3.) Zur quantitativ-analytischen Bestimmung wurden zwei Methoden angewandt:

a) Bestimmung mit 0,1 n NaOH auf abspaltbare funktionelle Gruppen,
b) Bestimmung mit 0,01 n $AgNO_3$ auf Chlorid nach Fajans.

Zu a) ist zu sagen, daß die benzoylierten Nucleosid-Derivate im Molekül drei Benzoylgruppen, eine Carbonsäureäthylestergruppe und am positiv geladenen Pyridin-N ein Chloridion besitzen. Es wurde versucht, durch Erhitzen mit NaOH diese Gruppen abzuspalten und das restliche NaOH durch Titration mit 0,1 n H_2SO_4 zu bestimmen.

0,0001 Mol des benzoylierten Nucleosid-Derivats wurden in einem enghalsigen Erlenmeyerkolben mit 10 ml 0,1 n NaOH und 10 ml dest. Wasser versetzt und 6 bis 8 Stunden auf einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde sorgfältig quantitativ die Reaktionslösung in einen weithalsigen Erlenmeyerkolben filtriert und nach dem Nachwaschen mit 0,1 n H_2SO_4 die restliche NaOH zurücktitriert. Aus der Differenz zwischen der vorgelegten 10 ml 0,1 n NaOH und der restlichen Menge NaOH kann der NaOH-Verbrauch berechnet und auf die Zahl der abgespaltenen Gruppen geschlossen werden.

Theoretisch müßten von den vorgelegten 10 ml 0,1 n NaOH 5 ml verbraucht sein, da die Produkte vier abspaltbare Gruppen und ein Chloridion im Molekül besitzen, die einer äquivalenten Menge von 0,0005 Mol NaOH entsprechen. Es

wurde in jedem Fall ein geringerer NaOH-Verbrauch festgestellt (3-4,5 ml), was offenbar auf Nichtspaltung der Carbonsäureäthylester-Gruppe zurückzuführen ist (Tabelle 7).

Zu b) Die Bestimmung des Chlorids in diesen oben angeführten Verbindungen erfolgte nach Fajans unter Verwendung von 0,01 n $AgNO_3$ mit Na-Fluoreszein als Indikator.

Es wurden 0,0001 Mol des benzoylierten Nucleosid-Derivats in einem enghalsigen Erlenmeyerkolben mit 20 ml dest. Wasser auf dem Wasserbad erhitzt. Dann kamen 3-4ml verd. HNO_3 hinzu, und es wurde solange weiter erhitzt, bis sich der unlösliche Teil zusammenballte und die Lösung aufklarte. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde diese filtriert und das Filter sorgfältig mit dest. Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde dann mit $NaHCO_3$ auf pH 7 eingestellt und mit 5 ml 2%iger Dextrin-Lösung versetzt, um das ausfallende AgCl zwecks besserer Erkennung der Farbveränderung kolloid in Lösung zu halten. Es wurde auf Abnahme der Fluoreszenz und Rosafärbung der Lösung durch rötlich gefärbte, am Äquivalenzpunkt ausgefallene AgCl-Teilchen titriert.

Zur Berechnung ist zu sagen, daß 0,0001 Mol der Analysenverbindung auch äquivalent 0,0001 Mol Chlorid-Ionen ist. Das wiederum entspricht 10 ml 0,01 n $AgNO_3$. Der Mehrverbrauch an $AgNO_3$-Lösung ist wahrscheinlich auf Adsorption von Ag^+-Ionen an AgCl oder Bindung, auch Einschluß von Ag^+-Ionen, durch Kohlenhydrat-Moleküle zurückzuführen. Auch ist der Endpunkt der Titration bei verschiedenen Analysenverbindungen nicht leicht zu erkennen. Im Ganzen kann auf ein Molekül der eingesetzten Analysensubstanz ein Chlorid-Ion gerechnet werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Quantitativ - analytische Bestimmungen

Pr.	Einwaage mg	Einwaage 10^{-4} Mol	verbr. ml 0,01 n $AgNO_3$	$\bar{M}$	Cl-Ionen 10^{-4} Mol	vorgelegte ml 0,1 n NaOH	verbr. ml 0,1 n NaOH	$\bar{M}$	Zahl der erfaßten Gruppen
1.	70,7	1	11,7	11,9	1	10	3,75	3,75	3 - 4
	70,7	1	12,1			10	3,75		
2.	72,2	1	16,4	16,7	1	10	3,9	4,05	4
	72,2	1	17,0			10	4,2		
3.	80,0	1	11,2	11,95	1	10	3,5	3,55	3 - 4
	80,0	1	12,7			10	3,6		
4.	84,3	1	12,1	12,25	1	10	3,8	3,85	4
	84,3	1	12,4			10	3,9		
5.	80,8	1	11,6	11,55	1	10	3,8	3,70	3 - 4
	80,8	1	11,5			10	3,6		
6.	83,6	1	11,4	11,4	1	10	3,7	3,85	4
	83,6	1	-			10	4,0		
7.	81,3	1	13,3	13,3	1	10	3,8	3,85	4
	81,3	1	-			10	3,9		
8.	68,2	0,5	11,9	12,65	1	10	3,8	3,6	7
	68,2	0,5	13,4			10	3,4		
9.	76,1	1	13,6	13,05	1	10	3,5	3,55	3 - 4
	76,1	1	11,5			10	3,6		
10.	84,1	1	13,1	12,80	1	10	4,2	4,25	4
	84,1	1	12,5			10	4,3		

Pr. = Produkt: 1. Nic.gly.rib.; 2. Nic.ala.rib.; 3. Nic.met. rib.; 4. Nic.S-bzl.cyst.rib.; 5. Nic.glu.rib.; 6. Nic.tryp.rib.; 7. Nic.tyr.rib.; 8. Di-Nic. lys.rib.; 9. Nic.gly.pF-rib.; 10.Nic.gly.gluc.

Es wurden von jeder Analysensubstanz je zwei Analysenansätze durchgeführt:
a) für die Chlorid-Bestimmung und
b) für die Bestimmung der abspaltbaren Molekülgruppen

5.3.3. Spezielle analytische Untersuchungsmethoden

5.3.3.1. Konstitutionsbestimmung durch Infrarotspektroskopie

Zur Erhärtung des Konstitutionsbeweises wurde außer den allgemeinen analytischen Methoden auch die spezielle der Infrarotspektroskopie angewandt. Dazu wurden verschiedene der dargestellten Nicotinylaminosäureester und benzoylierten Nucleosid-Derivate, die kristallin erhaltbar und mit KBr misch- und preßbar sind, spektroskopisch untersucht und der Absorptionsverlauf im Bereich der Wellenzahlen von 4000 cm^{-1} (Wellenlänge 2,5 μ) bis 525 cm^{-1} (19 μ) aufgezeichnet. Hierzu wurde ein Leitz-Infrarot-Gitterspektrograph Modell III G verwendet.

Da nicht jede der synthetisierten Produkte mit KBr misch- und preßbar und zum Teil auch nicht kristallin erhaltbar sind, wurde nur von folgenden Verbindungen ein Infrarotspektrogramm aufgenommen:

1.) von den Nicotinylaminosäureestern:
Nicotinylglycinäthylester (Nic.gly.est.), -methioninäthylester (Nic.met.est.), -S-benzyl-L-cysteinäthylester (Nic.S-bzl.cys.est.), -tryptophanäthylester (Nic.tryp.est.), -tyrosinäthylester (Nic.tyr.est.) und Di-Nicotinyl-lysinäthylester (Di-Nic.lys.est.);

2.) von den benzoylierten Nucleosid-Derivaten:
N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.rib.), -tryptophanäthylester-N^1-chlorid (Nic.tryp.rib.), -tyrosinäthylester-N^1-chlorid (Nic.tyr.rib.) und-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid (Nic.S-bzl.cys.rib.), Di-{N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl}-lysinäthylester-N^1-chlorid (Di-Nic.lys.rib.), N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.pF-rib.) und N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.gluc.).

Außerdem wurden zum Vergleich die Verbindungen N^1-[ß-D-Ri-

bofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Deb. Nic.gly.rib.), das debenzoylierte Produkt, und der rebenzoylierte N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester (Reb.Nic.gly.rib.) untersucht.

Vorschrift: Herstellung des Preßlings

1 g KBr (für Spektroskopie) wird mehrere Minuten lang mit 4-5 mg Analysensubstanz sorgfältig in einem Achatmörser gerieben und vermischt. Danach wird die Mischung auf den Preßstempel gleichmäßig aufgebracht und mit der Hand mittels eines Stempels vorsichtig angepreßt. Dann wird die Mischung in einer hydraulischen Presse bei einem Preßdruck von 250 kp/c m^2 zu einem durchsichtigen Preßling gepreßt. Dieser wird mit Hilfe einer Haltevorrichtung in den Strahlengang des IR-Gerätes gebracht. Die Aufzeichnung der Durchlässigkeit in % erfolgt graphisch.

5.3.3.2. Deutung der Absorptionsspektren der Nicotinylaminosäureester (110.)

Das Absorptionsspektrum der Verbindung Nic.gly.est. (Spektrum-Abb. Nr. 1) wird als Bezugsspektrogramm für die anderen Nicotinylaminosäureester verwendet. Für Nic.gly.est. werden folgende Absorptionsmaxima erhalten: Ein starkes Absorptionsmaximum bei 3250 cm^{-1} (Wellenlänge 3,1μ) und vier schmale mittelstarke Absorptionsmaxima zwischen 3050 cm^{-1} (3,3 - 3,45μ), davon eine stärkere Spitze bei 2950 cm^{-1} (3,4μ). Das starke Absorptionsmaximum ist wahrscheinlich auf H_2O und das bei 3050 cm^{-1} zusammen mit den anderen Absorptionen auf Streckschwingungen von -ν-NH und/oder -ν-OH- von Aminosäurenzurückzuführen (Glycin), die im Bereich von 3000-2900 cm^{-1} liegen.

Das folgende starke Absorptionsmaximum bei 1740 cm^{-1} (5,75μ) gibt die Streckschwingungen von -ν-C=O- amidähnlicher Verbindungen wieder. Die weiteren dicht aufeinander folgenden Absorptionsmaxima liegen bei: 1630 cm^{-1} (6,15μ), die Beugeschwingungen von -δ-NH sind, bei 1580 cm^{-1} (6,3μ), eine NH-Absorption von Peptiden durch Streckschwingungen von

-ν-C=N und -ν-C=C- in Pyridinderivaten, und eine Absorption bei 1520 cm^{-1} (6,55 μ), die wahrscheinlich durch Glycin hervorgerufen wird.

Die nächsten drei Absorptionsmaxima; die bei 1460 cm^{-1} (6,85 μ), 1400 cm^{-1} (7,15 μ) und 1370 cm^{-1} (7,3 μ) liegen, sind auf symmetrische Streckschwingungen von -ν-C=O- der Carboxalat-Ionen, die im Bereich von 1440 - 1340 cm^{-1} anzutreffen sind, zurückzuführen. Das Absorptionsmaximum bei 1260 cm^{-1} (7,95 μ) und das breite Absorptionsmaximum im Bereich 1220 - 1160 cm^{-1} (8,2 - 8,65 μ) geben die Streckschwingungen -ν-C=O von Estern wieder.

Die sechs folgenden Absorptionsmaxima: 1095 cm^{-1} (9,15 μ), 1070 cm^{-1} (9,35 μ), 1040 cm^{-1} (9,6 μ), 1030 cm^{-1} (9,75 μ), 995 cm^{-1} (10,05 μ) und 965 cm^{-1} (10,35 μ) geben die Ringschwingungen und CH-Deformationsschwingungen des Pyridinringes wieder, die im Bereich von 1100 - 1000 cm^{-1} und 900 - 650 cm^{-1} liegen und zu denen auch die Absorptionsmaxima bei 910 cm^{-1} (11,0 μ), 865 cm^{-1} (11,55 μ), 835 cm^{-1} (11,95 μ), 675 cm^{-1} (14,85 μ) und 620 cm^{-1} (16,1 μ) zählen.

Das breite und starke Absorptionsmaximum von 710 - 690 cm^{-1} (14 - 14,5 μ) gibt die Beugeschwingungen des monosubstituierten Benzols wieder und läßt auf das Vorhandensein von Toluolspuren schließen.

Vergleich der IR-Absorptionsaufzeichnungen des Nicotinylglycinäthylesters mit denen der anderen Nicotinylaminosäureester.

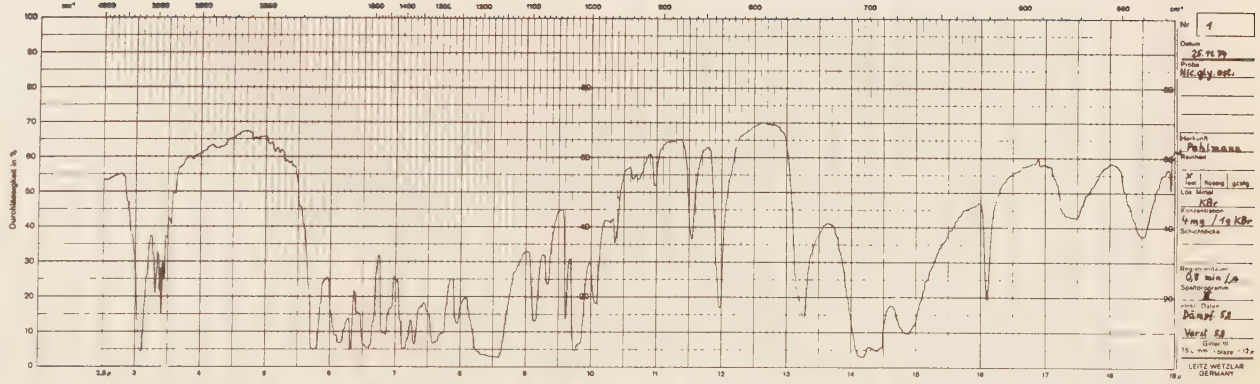
Die Verbindung Nic.met.est. (Abb. 2) gibt ein Absorptionsspektrum, das im Ganzen etwa dem des Nic.gly.est. entspricht. Es treten nur wenige Veränderungen auf: Im breiten Absorptionsbereich 1220 - 1160 cm^{-1} (8,2 - 8,65 μ) haben wir eine Aufspaltung in drei Absorptionsmaxima bei 1215 cm^{-1} (8,2 μ), 1190 cm^{-1} (8,4 μ) und 1170 cm^{-1} (8,55 μ). Es werden in diesem Bereich die Streckschwingungen -ν-C=O von Estern wiedergegeben. Die Absorptionsmaxima: 1125 cm^{-1} (8,9 μ) und 1040 cm^{-1} (9,65 μ) sind wesentlich schwächer. Das letztere ist nur noch eine Schulter des starken Absorptionsmaximums bei 1030 cm^{-1} (9,75 μ). Ferner fehlt das Absorptionsmaximum

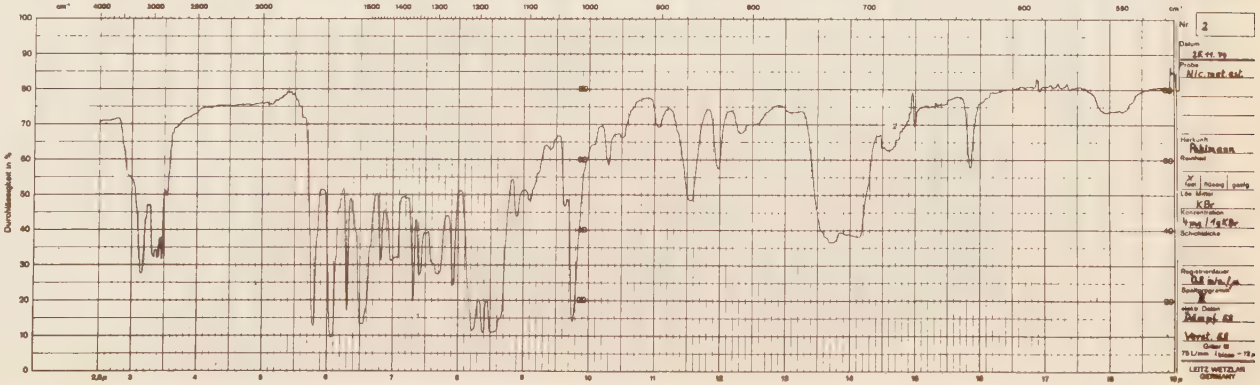
bei 995 cm^{-1} (10,05 μ) und das bei 755 cm^{-1} (13,25 μ). Das breite Absorptionsmaximum im Bereich von 740 - 705 cm^{-1} (13,5 - 14,15 μ) ist breiter als das des Nic.gly.est. (710 - 690 cm^{-1}; 14 - 14,5 μ) und etwas verschoben. Es gibt hier die Ringschwingungen des monosubstituierten Benzols wieder.

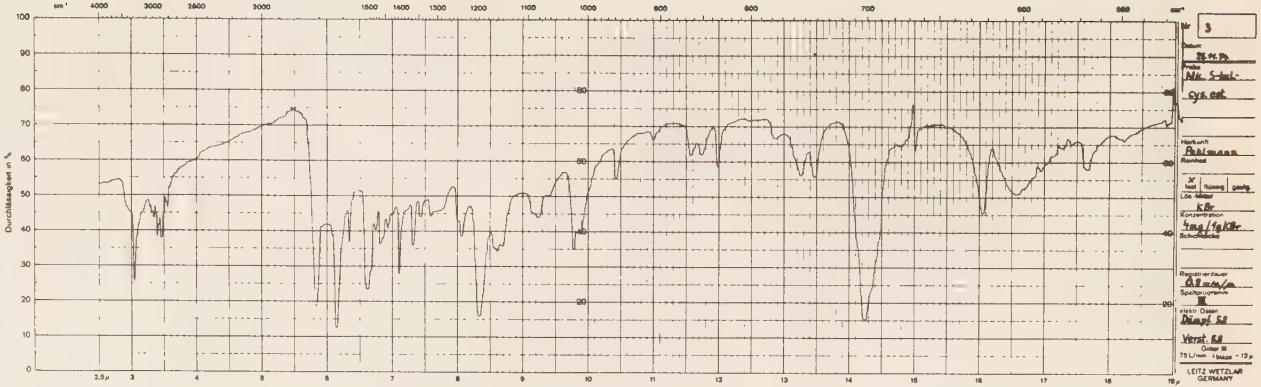
Die Verbindung Nic.S-bzl.cys.est. (Abb. 3) zeigt gegenüber Nic.gly.est. ein leicht verändertes Absorptionsspektrum. Im Bereich von 1370 - 1280 cm^{-1} (7,3 - 7,8 μ) sind die Absorptionsmaxima abgeschwächt, desgleichen das Absorptionsmaximum bei 1200 cm^{-1} (8,35 μ), das schmal und spitz gegenüber dem breiten des Nic.gly.est. (1220 - 1160 cm^{-1}) ist. Abgeschwächt ist auch das Absorptionsmaximum bei 1080 cm^{-1} (9,25 μ). Es fehlt das Absorptionsmaximum bei 995 cm^{-1} (10,05 μ). Schwächer sind auch die Absorptionen im Bereich 865 - 835 cm^{-1} (11,55 - 11,95 μ) und im Bereich 755 - 745 cm^{-1} (13,25 - 13,45 μ). Das Absorptionsmaximum bei 700 cm^{-1} (14,25 μ) ist dagegen schmal und tief und gibt die Beugeschwingungen aus der Ebene des Benzolringes wieder, was wahrscheinlich auf die Einwirkung der Benzylgruppe zurückzuführen ist.

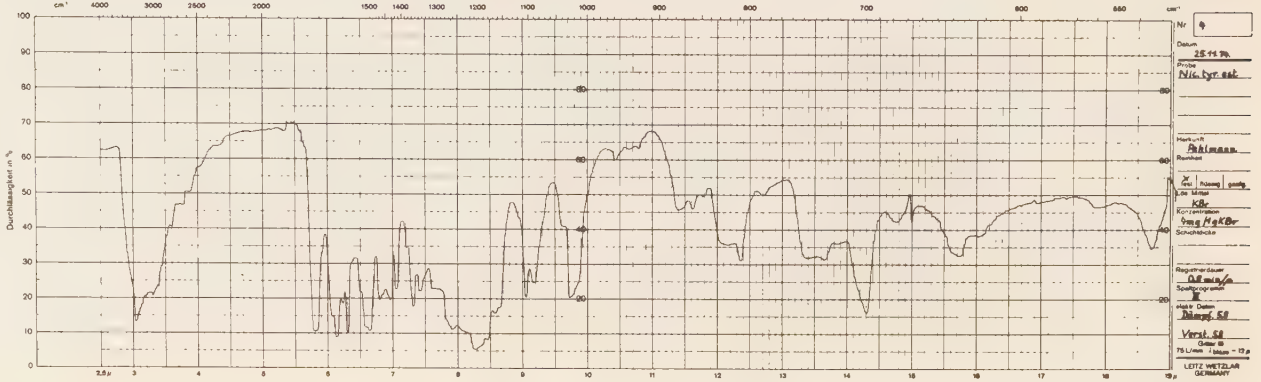
Beim Nic.tyr.est. (Abb. 4) ist das Absorptionsspektrum gegenüber dem des Nic.gly.est. vielfach vereinfacht. Es fehlen die einzelnen Absorptionsmaxima zwischen 4100 - 2400 cm^{-1} (2,8 - 4,2 μ), die in einen breiten Absorptionsbereich der oben angegebenen Breite fallen. Im Bereich von 1280 - 1150 cm^{-1} (7,8 - 8,7 μ) haben wir ebenfalls ein breites Absorptionsmaximum mit einer Spitze bei 1210 cm^{-1} (8,25 μ). Es fehlen ferner im Bereich von 995 cm^{-1} (10,05 μ) bis 870 cm^{-1} (11,35 μ) die Absorptionsmaxima, was wahrscheinlich auf das Fehlen von Pyridinspuren schließen läßt.

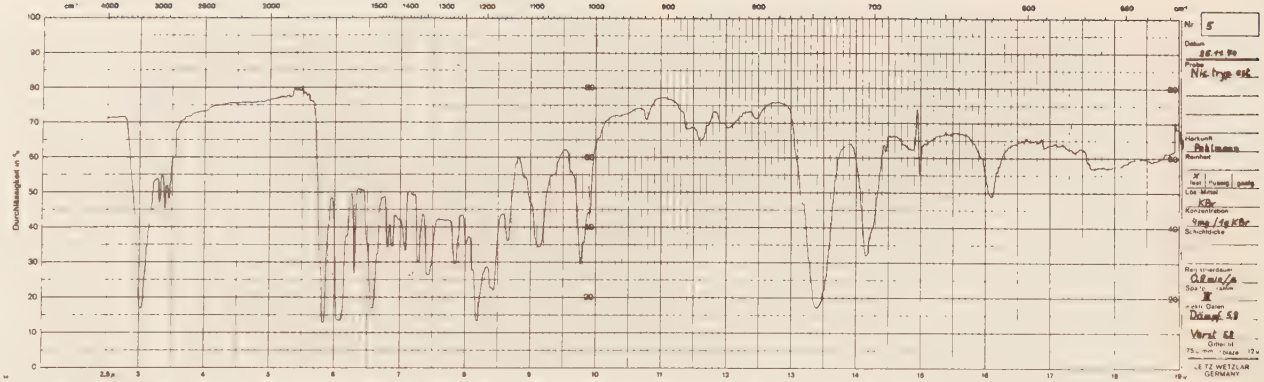
Das Absorptionsspektrum von Nic.tryp.est. (Abb. 5) ist gegenüber dem des Nic.gly.est. nur leicht verändert. Im mittleren Wellenzahlbereich von 1260 - 1160 cm^{-1} (7,95 - 8,65 μ) haben wir eine größere Aufspaltung des breiteren Absorptionsmaximums von 1220 - 1160 cm^{-1} in mehrere: 1250 cm^{-1} (8,0 μ), 1210 cm^{-1} (8,2 μ), ein sehr großes, scharfes Maximum, ferner 1190 cm^{-1} (8,45 μ) und 1150 cm^{-1} (8,65 μ). Im Bereich von

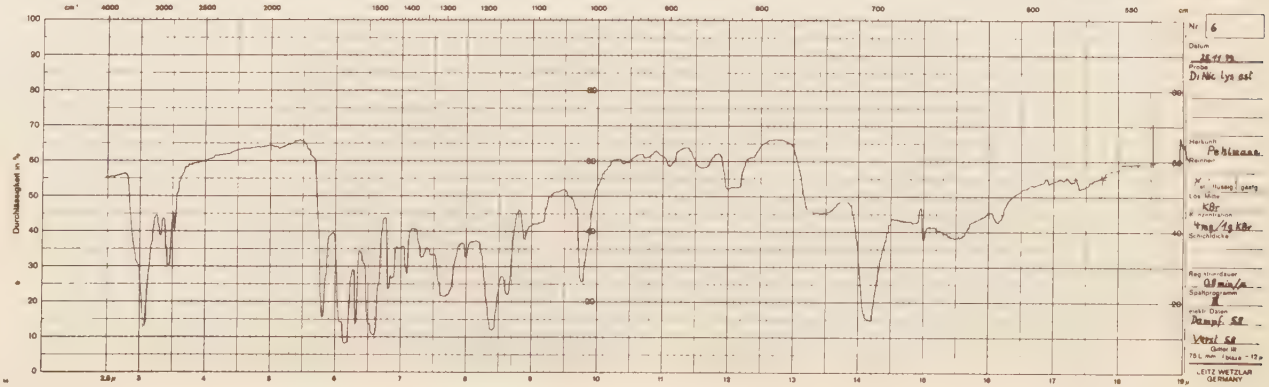

Nr 1
Datum 25.11.79
Probe Nic.gly.est.
Herkunft Pohlmann
Reinheit
Lös. Mittel KBr
Konzentration 4mg / 1g KBr
Schichtdicke
Registrierdauer 0,8 min / µ
Spaltprogramm
Dämpf. 5,8
Verst. 5,8
Gitter III
LEITZ WETZLAR GERMANY
Durchlässigkeit in %


Nr 2
Datum 25.11.79
Probe Nic.met.est.
Herkunft Pohlmann
Reinheit
Lös. Mittel KBr
Konzentration 4mg / 1g KBr
Schichtdicke
Registrierdauer 0,8 min / µ
Spaltprogramm
Dämpf. 5,8
Verst. 5,8
Gitter III
LEITZ WETZLAR GERMANY
Durchlässigkeit in %


Nr 3
Datum
Probe
Nic. S-bul.-
cys. est.
Herkunft
Pahlmann
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
4mg/1gKBr
Schichtdicke
Registrierdauer
0,8 min/m
Spaltprogramm
III
elektr. Daten
Dämpf. 58
Verst. 58
Gitter III
75 L/mm
LEITZ WETZLAR
GERMANY
Durchlässigkeit in %


Nr 4
Datum
25.11.74
Probe
Nic. tyr. est.
Herkunft
Pahlmann
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
4mg/1gKBr
Schichtdicke
Registrierdauer
0,8 min/m
Spaltprogramm
III
elektr. Daten
Dämpf. 58
Verst. 58
Gitter III
75 L/mm
LEITZ WETZLAR
GERMANY
Durchlässigkeit in %


Nr 5
Datum
Probe
Nic. tryp. est.
Herkunft
Pehlmann
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
4mg/1g KBr
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
Dampf. 58
Verst. 58
Gitter III
LEITZ WETZLAR GERMANY
Durchlässigkeit in %


Nr 6
Datum
Probe
Di Nic. lys. est
Herkunft
Pehlmann
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
4mg/1g KBr
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
Dampf. 58
Verst. 58
Gitter III
LEITZ WETZLAR GERMANY
Durchlässigkeit in %

995 cm^{-1} (10,05 μ) bis 765 cm^{-1} (13,05 μ) fehlen die Absorptionen oder sind abgeschwächt.

Desgleichen zeigt auch das Di-Nic.lys.est. (Abb. 6)-Absorptionsspektrum gegenüber dem des Nic.gly.est. eine vereinfachte Absorption, in dem einige Absorptionsmaxima fehlen. Im mittleren Bereich von 1100 - 1040 cm^{-1} (9,05 - 9,6 μ) fehlen die Absorptionsmaxima und im Bereich von 995 - 770 cm^{-1} (10,05 - 12,95 μ) sind nur schwach ausgeprägte Absorptionen vorhanden. Bei 705 cm^{-1} haben wir ein sehr starkes Maximum.

Die Absorptionsstärke hängt auch von der Durchlässigkeit des Preßlings ab, der nicht in allen Fällen, wie beim Nic.tyr.est., Nic.tryp.est. und Di-Nic.lys.est., klar und voll lichtdurchlässig hergestellt werden konnte.

5.3.3.3. Deutung der Absorptionsspektren der benzoylierten Nucleosid-Derivate

Die Verbindung Nic.gly.rib. (Abb. 7) wurde, da sie analytisch am besten definiert ist, als Bezugssubstanz verwendet.

Es wurden folgende Absorptionsmaxima erhalten: Drei Absorptionsmaxima im Wellenzahlbereich von 3350 cm^{-1} (Wellenlänge 3 μ), 3180 cm^{-1} (3,15 μ) und 3020 cm^{-1} (3,3 μ) von mittlerer Absorptionsstärke. Das erste Maximum (3350 cm^{-1}) deutet auf einen H_2O-Gehalt und zusammen mit dem zweiten Maximum (3180 cm^{-1}) auf NH - Valenzschwingungen eines primären Amids. Das dritte Maximum (3020 cm^{-1}) zusammen mit zwei kleinen Absorptionsschultern bei 2900 und 2850 cm^{-1} sind offenbar auf Streckschwingungen - ν-NH und/oder - ν-OH- von Aminosäuren (Glycin) zurückzuführen. Eine deutliche Absorption nahe 3030 cm^{-1} geben auch =CH - Valenzschwingungen aromatischer Bindungen und nahe 3020 cm^{-1} -CH - Valenzschwingungen der Pyridine. Im Bereich 3000 bis 2900 cm^{-1} (3,3 - 3,5 μ) haben wir auch Streckschwingungen - ν-CH in Methyl- und Methylen-Bindungen.

Das folgende Maximum, das sehr ausgeprägt ist, liegt bei 1715 cm^{-1} (5,85 μ) und gibt Streckschwingungen - ν-C=O- von amidähnlichen Verbindungen (Wellenzahlbereich 1740 - 1700 cm^{-1}) und aromatisch konjugierter Ester des Typs:

-C(=O)-O-R wieder (1730 - 1715 cm^{-1}). Dieses Absorptionsmaximum ist besonders groß, was auf einen hohen Anteil dieser Ester schließen läßt.

Die Maxima 1670 cm^{-1} (6 μ) und 1620 cm^{-1} (6,2 μ), die schwächer als die vorigen ausgeprägt sind, geben Beugeschwingungen - δ-NH und Streckschwingungen - ν-COO^- von Aminosäuren (1600 - 1660 cm^{-1}) und die Maxima mittlerer Absorptionsstärke bei 1590 cm^{-1} (6,3 μ), 1580 cm^{-1} (6,35 μ) und 1490 cm^{-1} (6,75 μ) Streckschwingungen - ν-C=N und - ν-C=C von in 3-Stellung substituierten Pyridinen wieder.

Das Maximum bei 1540 cm^{-1} (6,5 μ) gibt die NH-Absorptionen von Peptiden wieder, die auch in den Wellenzahlbereichen von 1630 - 1620 cm^{-1} und 1580 - 1575 cm^{-1} und um 1240 cm^{-1} liegen.

Symmetrische Streckschwingungen - ν-C=O von Carboxylat-Ionen R-COO^- werden von den drei mittelstarken Absorptionsmaxima 1445 cm^{-1} (6,93 μ), 1370 cm^{-1} (7,3 μ) und 1350 cm^{-1} (7,4 μ) wiedergegeben. Das erste ist sehr ausgeprägt.

Es folgen dann vier Maxima: 1310 cm^{-1} (7,63 μ), 1260 cm^{-1} (7,5 μ), 1175 cm^{-1} (8,5 μ) und ein sehr starkes und breites Maximum im Bereich von 1115 bis 1090 cm^{-1} (8,95 - 9,15 μ). Das Maximum bei 1230 cm^{-1} ist gleichfalls sehr stark und breit ausfallend. Diese vier geben die Streckschwingungen - ν-C=O und die Gerüstschwingungen - ν-C=CO=O von Estern des Typs: -COOR wieder.

Die Absorptionsmaxima bei 1200 cm^{-1} (8,3 μ), 1070 cm^{-1} (9,35 μ) und 1025 cm^{-1} (9,75 μ), die sehr stark sind, sind auf Deformationsschwingungen des Pyridinringes zurückzuführen. Ein sehr starkes Maximum bei 710 cm^{-1} (14,1 μ) und ein mittelstarkes bei 685 cm^{-1} (14,6 μ) geben die CH-Deformationsschwingungen des Pyridinringes wieder. Die Beugeschwingungen - δ-CH aus der Ringebene des Pyridins geben

bei 805 cm^{-1} (12,45μ) ein schwache Absorption.

Aus dem Spektralabsorptionsverlauf ist folgendes zu erkennen:

Im Bereich hoher Wellenzahlen (3400 - 2800 cm^{-1}) wird ein H_2O-Gehalt, die NH-Valenzschwingungen primärer Amide, Streckschwingungen der NH- und/oder OH-Gruppe der Aminosäure und Valenzschwingungen von =CH- und -CH-Bindungen des aromatischen und heterocyclischen Teils des Moleküls wiedergegeben.

Im Bereich mittlerer Wellenzahlen (1750 - 1000 cm^{-1}) finden wir eine Anzahl Maxima, die das Vorhandensein amidähnlicher Bindungen, einer großen Zahl Benzoylgruppen als aromatisch konjugierte Ester des Typs C_6H_5-COOR, von -COC^--Gruppen und von 3-substituierten Pyridingruppen bestätigen.

Die Maxima mit niedrigen Wellenzahlen unter 1000 cm^{-1} sind auf Beuge- und Deformationsschwingungen des Pyridinringes zurückzuführen.

Mit diesem Ergebnis (Abb. 7) kann das Molekül des N^1- [2'. 3',5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorids bestätigt werden.

Vergleich der IR-Absorptionsaufzeichnung obiger Verbindung mit denen der anderen benzoylierten Nucleosid-Derivate.

Die Verbindung Nic.tryp.rib. (Abb. 8) zeigt ein gleich aufgebautes Absorptionsspektrum wie Nic.gly.rib., das nur geringe Veränderungen aufweist. Im Bereich 1250 - 1170 cm^{-1} fehlt das Maximum bei 1200 cm^{-1}. Dafür haben wir bei 745 cm^{-1} (13,45μ) ein neues starkes Absorptionsmaximum, das auf Beugeschwingungen - δ-CH aus der Ebene des Benzolringes zurückzuführen ist.

Das Absorptionsspektrum von Nic.tyr.rib. (Abb. 9) zeigt ein ähnliches Bild wie das des Nic.gly.rib. Es sind Veränderungen in der Absorptionsstärke im Bereich 3400 - 3000 cm^{-1} feststellbar, ferner Veränderungen der Absorptionsstärke und -breite der Maxima im mittleren Bereich (1300 - 1300 cm^{-1}) und ein neues Maximum im Bereich von 825 cm^{-1} (12,1μ), das auf CH-Waggingschwingungen zweier freier und benachbar-

ter H-Atome substituierter Benzole zurückgeht.

Das Absorptionsspektrum des Nic.S-bzl.cyst.rib. (Abb. 10) zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem des Nic.gly.rib. Es sind nur leichte Veränderungen im größeren und mittleren Wellenbereich festzustellen, die auf Veränderungen der Absorptionsstärke beruhen.

Das Absorptionsspektrum des Di-Nic.lys-rib. (Abb. 11) zeigt keine großen Veränderungen. Es treten nur einige Veränderungen in der Absorptionsstärke und -breite der Maxima auf. Im mittleren Bereich von 1250 - 1170 cm^{-1} fehlt das Maximum bei 1200 cm^{-1}.

Große Ähnlichkeiten mit dem Absorptionsspektrum des Nic. gly.rib. hat das des Nic.gly.gluc. (Abb. 12), welches nur in den Absorptionsstärken und -breiten unterscheidet.

Die Verbindung Nic.gly.pF-rib. (Abb. 13) zeigt allgemein das gleiche Absorptionsspektrum wie Nic.gly.rib., dessen Maxima in der Absorptionsstärke und -breite verändert sind. Auffällig sind drei neue Maxima mittlerer Absorptionsstärke, die bei 855 cm^{-1} (11,8μ), 690 cm^{-1} (14,5μ) und 608 cm^{-1} (16,45μ) liegen und eine Veränderung der Maxima bei 1110 cm^{-1} (8,95μ) bis 1090 cm^{-1} (9,15μ) und 1260 cm^{-1} (7,9μ) bis 1175 cm^{-1} (8,5μ). Nach der Literatur (10) zeigen p-Fluorbenzol Verbindungen bei 1110 cm^{-1} und 856 cm^{-1} Absorptionsmaxima.

Allgemein ist zu sagen, daß sich die Absorptionsspektren ähneln. Die Veränderungen gegenüber dem beschriebenen Absorptionsspektrum des Nic.gly.rib. sind auf andere Aminosäureester und auf mit Fluor substituierte Benzoylgruppen zurückzuführen. Die große Ähnlichkeit mit dem Nic.gly.rib.-Spektrum läßt aber auf einen gleichen Molekülaufbau schließen.

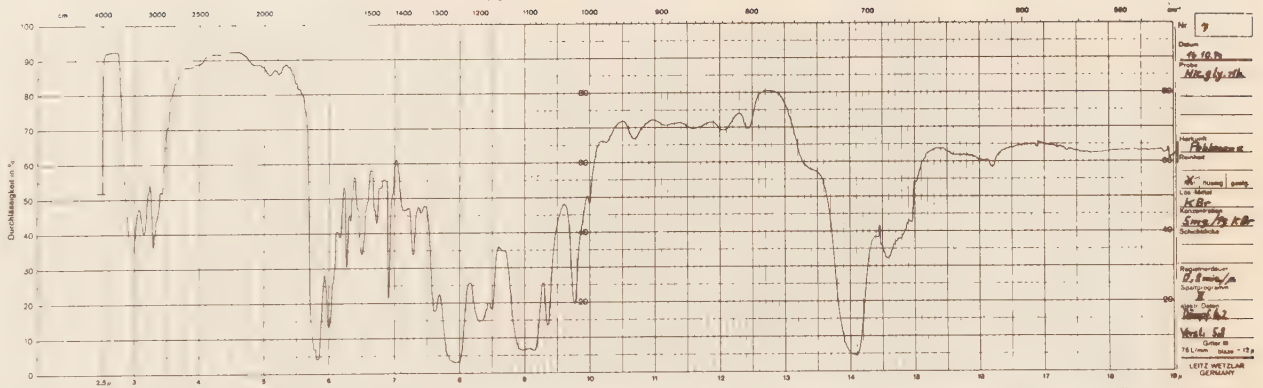
Die Verbindung N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Deb.Nic.gly.rib.) zeigt ein IR-Absorptionsspektrum (Abb. 14), das gegenüber den benzoylierten Verbindungen stark vereinfacht ist. Wir haben im Wellenzahlbereich von 3500 - 3000 cm^{-1} (2,8 - 3,3μ) ein starkes Absorptionsmaximum, das sehr glatt und breit ist

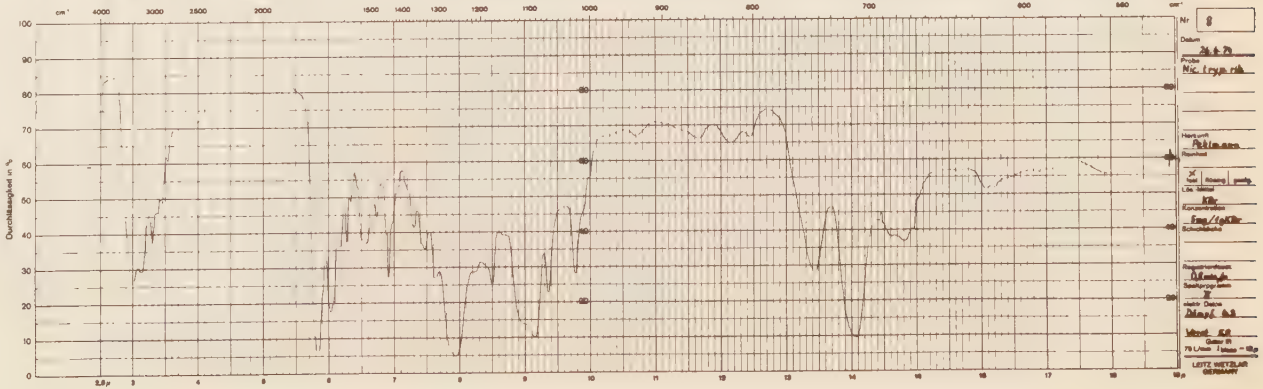
und in dem fast alle Nebenmaxima fehlen. Es deutet auf einen H_2O-Gehalt hin und auf NH-Valenzschwingungen primärer Amide und CH-Valenzschwingungen von Pyridinen (3180 und 3020 cm^{-1}). Das Maximum bei 1715 cm^{-1} (5,85 μ), das die Streckschwingungen - ν-C=O amidähnlicher Verbindungen und aromatisch konjugierter Ester des Typs C_6H_5-COOR wiedergibt, fehlt.

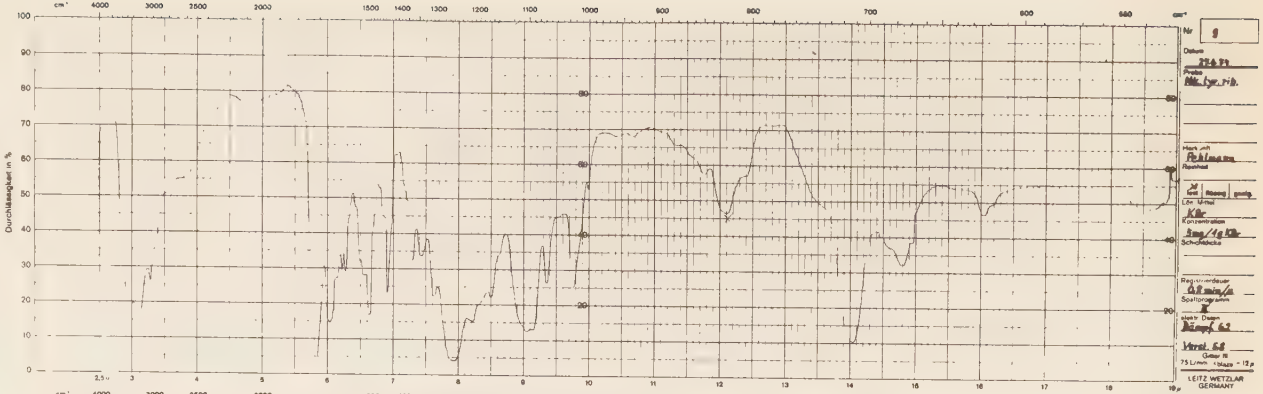
Desgleichen fehlen im Bereich 1310 bis 1175 cm^{-1} die ausgeprägten Maxima der aromatisch konjugierten Ester obigen Typs. Im Bereich von 800 bis 550 cm^{-1} ist kein Maximum festzustellen, sondern nur eine allgemeine Absorption. Offenbar ist diese auf eine gewisse Undurchlässigkeit des von dieser Verbindung nur schwierig herzustellenden Preßlings zurückzuführen. Aus dem übrigen Spektrum ist das Fehlen von Benzoylgruppen im Molekül feststellbar, so daß eine Abspaltung dieser Molekülgruppen vermutet werden kann.

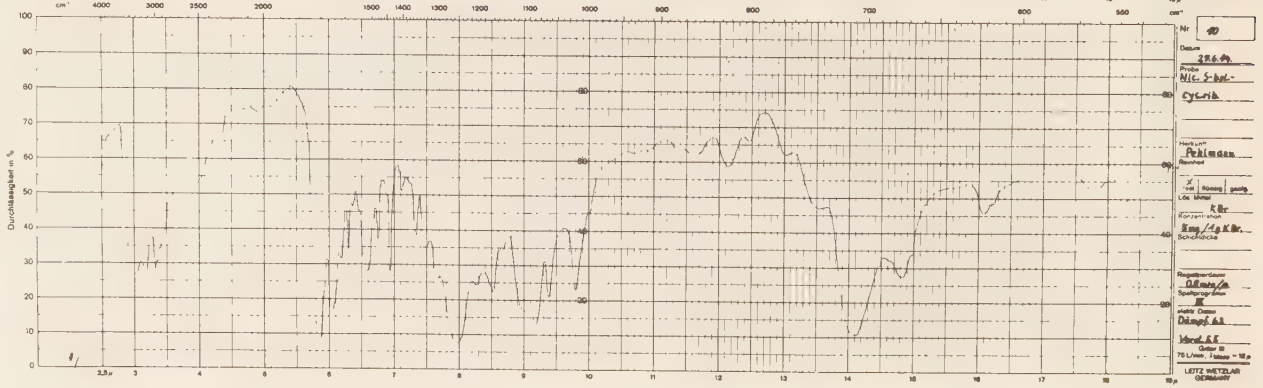
Die Deutung dieses IR-Absorptionsspektrums betrifft das rebenzoylierte Nic.gly.rib., das durch Behandeln des Deb.Nic.gly.rib. wieder in das N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester mit großer Wahrscheinlichkeit zurückverwandelt wurde.

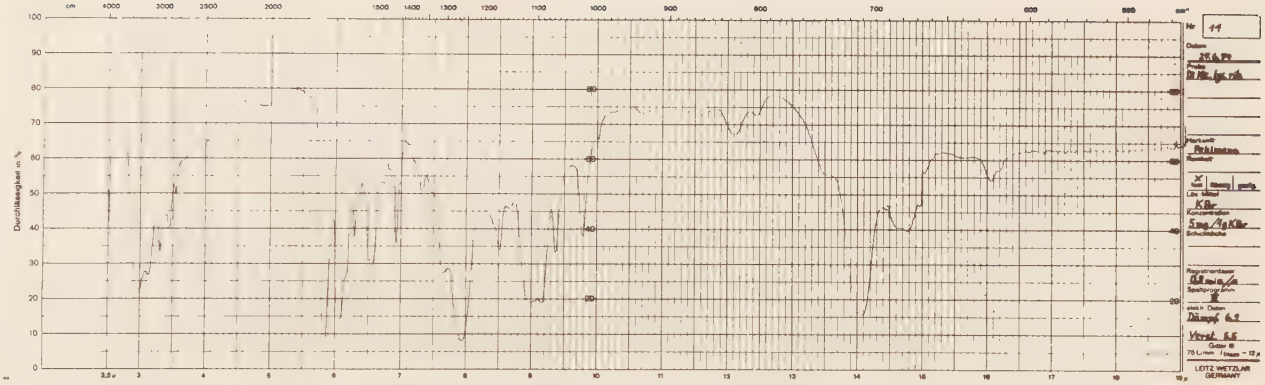
Das IR-Absorptionsspektrum des rebenzoylierten Produktes (Abb. 15) zeigt eine sehr große Ähnlichkeit mit dem des Nic.gly.rib.-Ausgangsprodukts. Im Bereich von 3500 - 3000 cm^{-1} (2,8 - 3,3 μ) haben wir ein sehr starkes Absorptionsmaximum, das auf einen H_2O-Gehalt und auf NH-Valenzschwingungen eines primären Amids, dessen Absorptionsbande bei 3180 cm^{-1} liegt, hinweist. Die Maxima im Bereich 2900 bis 2800 cm^{-1} sind offenbar Streckschwingungen - ν-NH und/oder - ν-OH von Aminosäuren (Glycin). Ein starkes Absorptionsmaximum ist auch bei 1715 cm^{-1} (5,85 μ) erkennbar, das die Streckschwingungen - ν-C=O von amidähnlichen Verbindungen und aromatisch konjugierter Ester des Typs C_6H_5-COOR wiedergibt. Im Gegensatz zum Nic.gly.rib.-Ausgangsprodukt sind die Absorptionsmaxima im Bereich 1715 - 1450 cm^{-1} leicht verändert. Der Absorptionsbandenbereich liegt tiefer - im Durchlässigkeitsbereich 10 - 30% -

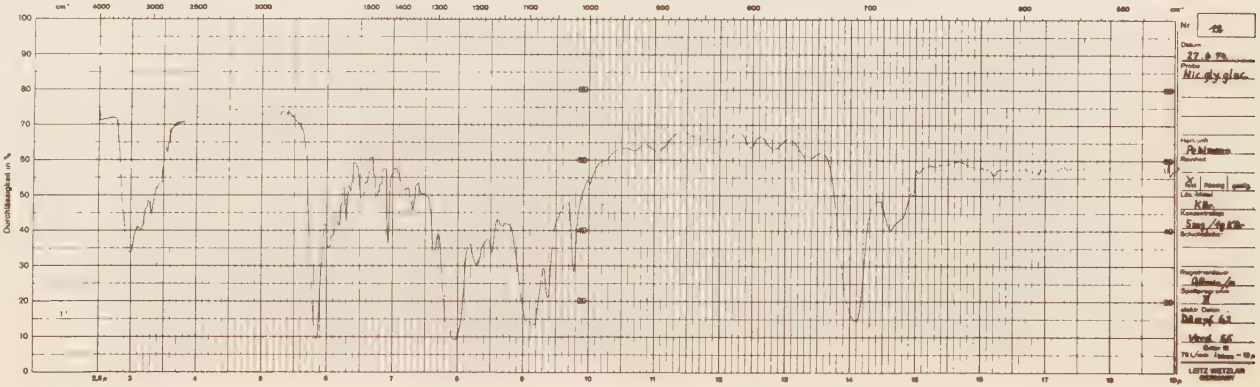

Durchlässigkeit in %
Nr 7
Datum
Probe
Hersteller
Rauhheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
Vergl. Sol
Gitter III
LEITZ WETZLAR
GERMANY

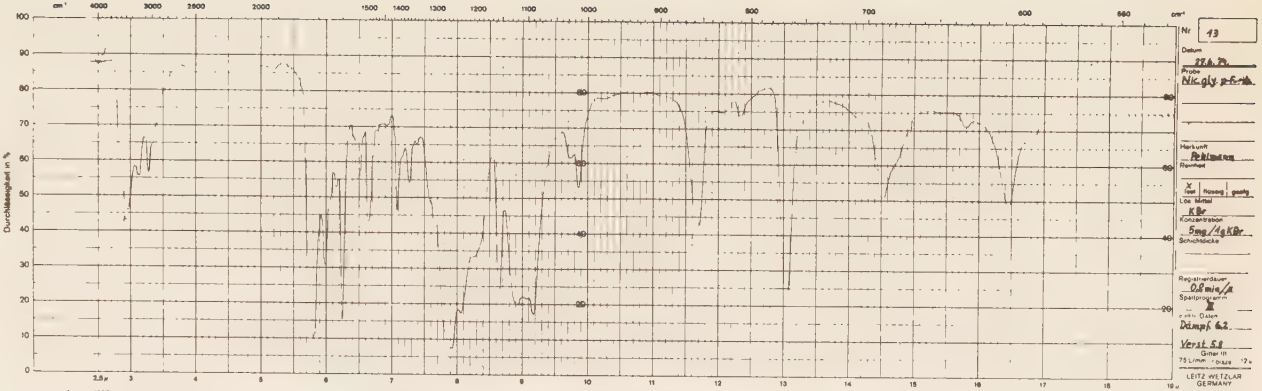

Durchlässigkeit in %
Nr 8
Datum
Probe
Hersteller
Rauhheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
Vergl. Sol
Gitter III
LEITZ WETZLAR
GERMANY

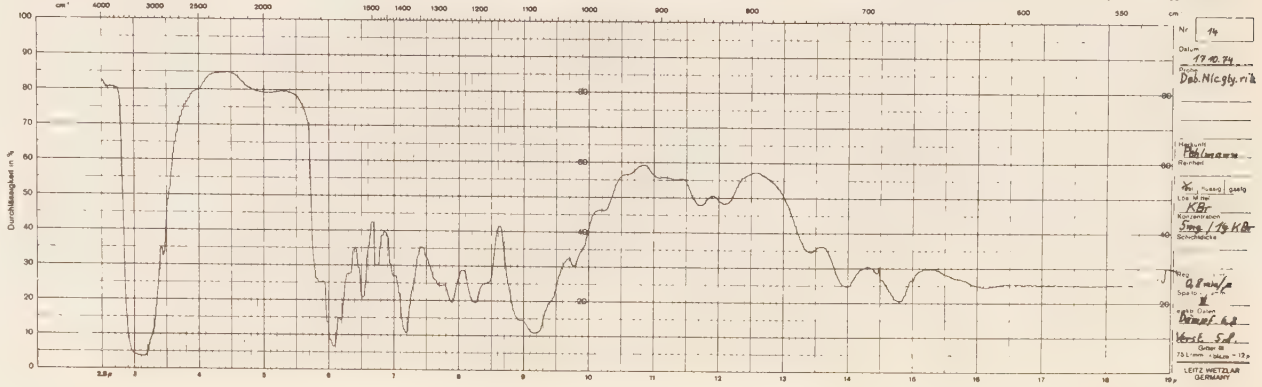

Durchlässigkeit in %
cm⁻¹
Nr 9
Datum
Probe
Nic. tyr. rib.
Herkunft
Pehlmann
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
Verst. 6.8
Gitter III
75 L/min
LEITZ WETZLAR
GERMANY

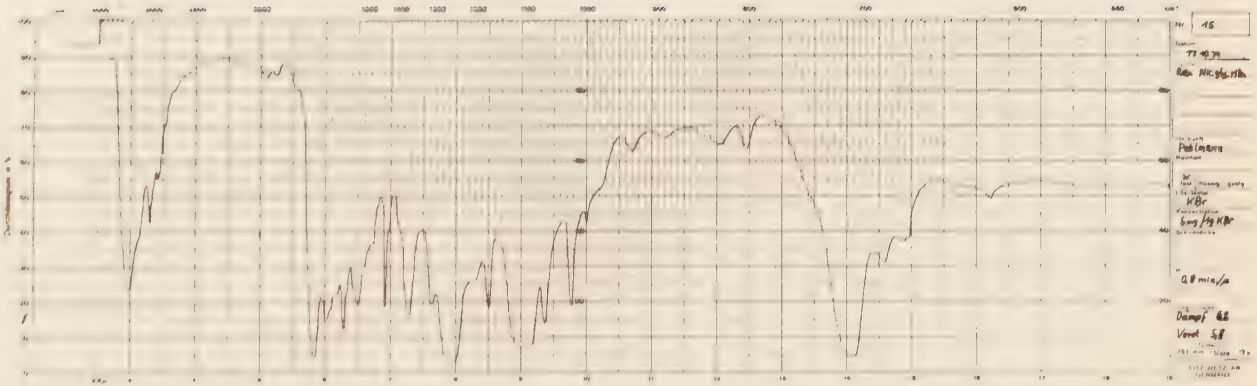

Durchlässigkeit in %
cm⁻¹
Nr 10
Datum
Probe
Nic. S-bel.-
Cyc. rib.
Herkunft
Pehlmann
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
Verst. 6.5
Gitter III
75 L/min
LEITZ WETZLAR
GERMANY


Durchlässigkeit in %
Nr 14
Datum
Probe
Herkunft
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
elektr. Daten
Verst. 6,5
LEITZ WETZLAR GERMANY


Durchlässigkeit in %
Nr 18
Datum
Probe
Herkunft
Reinheit
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
Schichtdicke
Registrierdauer
Spaltprogramm
elektr. Daten
Verst. 6,5
LEITZ WETZLAR GERMANY


cm⁻¹
4000 3000 2500 2000 1500 1400 1300 1200 1100 1000 900 800 700 600 550
Durchlässigkeit in %
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
2,5 μ 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 μ
Nr 13
Datum
Probe
Herkunft
Reinheit
fest flüssig gasig
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
5mg/1gKBr
Schichtdicke
Registrierdauer
0,8 min/μ
Spaltprogramm
II
Dämpf. 6,2
Verst. 5,8
Gitter III
75 U/min
LEITZ-WETZLAR
GERMANY


cm⁻¹
4000 3000 2500 2000 1500 1400 1300 1200 1100 1000 900 800 700 600 550
Durchlässigkeit in %
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
2,5 μ 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 μ
Nr 14
Datum
Probe
Herkunft
Reinheit
fest flüssig gasig
Lös. Mittel
KBr
Konzentration
5mg/1gKBr
Schichtdicke
0,8 min/μ
II
Dämpf. 6,2
Verst. 5,8
Gitter III
75 U/min
LEITZ-WETZLAR
GERMANY


15
Pohlmann
KBr
Dampf
Verd

und die einzelnen Banden sind auch weniger stark ausgeprägt. Dieser Bereich umfaßt die Absorptionsbanden der Beuge- und Streckschwingungen von -ν-NH und -ν-COO- der Aminosäuren (1670, 1620, 1600-1660 cm^{-1}) und auch die Streckschwingungen -ν-C=N- und -ν-C=C- von in 3-Stellung substituierten Pyridinen. Offenbar sind dort leichte Veränderungen im Molekülaufbau eingetreten. Das Gleiche gilt auch für das Maximum bei 1540 cm^{-1} (6,5μ), das die NH-Absorption von Peptiden wiedergibt. Die drei Maxima bei 1445, 1370 und 1350 cm^{-1} (6,9 - 7,4μ), die die -ν-C=O-Streckschwingungen wiedergeben, und auch die vier Maxima bei 1310, 1260, 1175 und 1115 - 1090 cm^{-1} (7,6 - 9,15μ) sind vorhanden. Von diesen ist nur die Absorption im Bereich von 1200 - 1100 cm^{-1} (8,1 - 8,3μ) verändert. Diese Maxima geben die Streckschwingungen und die Gerüstschwingungen -ν-C-CO-O- von Estern des Typs C_6H_5-COOR wieder. Der übrige Absorptionsspektrum-Bereich des rebenzoylierten Nic.gly.rib. ist mit dem des Nic.gly.rib.-Ausgangsprodukts fast identisch.

Bei der Rebenzoylierung treten nur wenige Veränderungen im IR-Absorptionsspektrum auf, was auf ein kaum verändertes Molekül schließen läßt.

5.3.3.4. Untersuchungen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Im Rahmen der speziellen analytischen Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen wurde auch die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Es wurden Proben der hergestellten Nicotinylaminosäureäthylester und benzoylierten Nucleosid-Derivate einer Hydrolyse mit 10%iger NaOH unterzogen, anschließend wurde eine geringe Hydrolysatmenge auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und gegen eine n-Propanol/NH_3-Lösung (7:3) eindimensional laufen gelassen. Als Vergleich wurden Proben reiner Aminosäuren aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die Aminosäuren durch Ninhydrin markiert. Die Kieselgelschicht wurde dann zwecks Konservierung mit Latex verfestigt, fixiert und dann unter Wasser mit einer Plastikfolie abge-

zogen. Es wurden dann die R_f-Werte berechnet und verglichen. Von den Platten wurden auch Abbildungen (Nr.16-32) hergestellt, die hier beigefügt sind.

Von folgenden Nicotinylaminosäureestern werden Dünnschichtchromatogramme wiedergegeben:

Nicotinylglycinäthylester (Nic.gly.est.), -methioninäthylester (Nic.met.est.), -S-benzyl-L-cysteinäthylester (Nic.S-bzl.cys. est.), -tryptophanäthylester (Nic.tryp.est.), -tyrosinäthylester (Nic.tyr.est.) und Di-[Nicotinyl]-lysinäthylester (Di-Nic.lys.est.).

Von den benzoylierten Nucleosiden werden sämtliche oben angegebenen einschließlich des debenzoylierten und rebenzoylierten Produkts chromatographisch untersucht. Die Ergebnisse werden in den Tabellen 8 und 9 wiedergegeben.

Vorschrift zur Hydrolyse mit nachfolgender Dünnschichtchromatographie:

1-2 x 10^{-4} Mol Nicotinylaminosäureester bzw. benzoyliertes Nucleosid-Derivat werden mit 10 ml 10%iger NaOH 8 Stdn. auf kochendem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt, anschließend zur Trockne eingedampft und dann mit 10 ml Wasser aufgenommen, filtriert und davon mit einer Kapillare eine kleine Probe des Hydrolysats auf eine schnellaufende Kieselgel-Dünnschichtplatte aufgetragen. Zum Vergleich werden Proben reiner Aminosäuren verwendet. Die Platte wird dann in eine n-Propanol/NH_3 - haltige Glaswanne gestellt und das Laufmittel über 10 cm laufen gelassen. Dann wird die Platte getrocknet, mit Ninhydrin besprüht und durch 15-minütiges Erwärmen im Trockenschrank der Farbstoff entwickelt. Die entwickelte Platte wird zur Konservierung mit Latexlösung Neatan besprüht, getrocknet, mit einer Kunststoff-Folie fixiert und die Schicht unter Wasser abgezogen, die getrocknet und auf eine Papierseite aufgeklebt wird.

Der R_f-Wert ist der Quotient aus dem Abstand des Farbfleckes zur Auftragungslinie und dem Abstand der Laufmittelgrenze zur Auftragungslinie. Die R_f-Werte für die Nicotinylaminosäureester werden in der Tabelle 8 und die der benzoylierten Nucleosid-Derivate in Tabelle 9 wiedergegeben.

Die hydrolysierten Nicotinylaminosäureester ergeben R_f-Werte, die mit denen für die Vergleichsaminosäuren errechneten Werte übereinstimmen. Die Ausnahme bildet Nic.S-bzl.cys.est., das im Chromatogramm zwei Ninhydrin-Aminosäure-Farbflecken mit den R_f-Werten 0,607 und 0,674 zeigt. Diese beiden liegen oberhalb des R_f-Wertes vom Cystein als Vergleichssubstanz (R_f = 0,521). Die Ursachen liegen wahrscheinlich in der Benzylierung des Cystein-Teils des Nicotinylaminosäureester-Moleküls. Ein zweidimensionales Chromatogramm, in dem als Vergleichssubstanzen neben Cystein auch S-Benzyl-L-cysteinäthylester und S-Benzyl-L-cystein aufgetragen wurden, zeigt Farbflekken, die mit denen des S-Benzyl-L-cysteinäthylesters annähernd übereinstimmen.

Die hydrolysierten Nucleosid-Derivate ergeben nach der Hydrolyse ebenfalls mit dem Ninhydrin Farbflecke, die durch Reaktion der abgespaltenen Aminosäure mit dem Ninhydrin entstehen und deren Abstände von der Auftragungslinie mit den der Vergleichsaminosäuren annähernd übereinstimmen.

Einige der hydrolysierten Produkte zeigen noch einen zweiten sehr schwachen, zum Teil verwischten Farbfleck unterhalb des Aminosäurefarbfleckes. Der betreffende Farbfleck ist oft zur Auftragungslinie verwischt. Offenbar haben die anderen Hydrolyseprodukte an der Verwischung des Farbflecks Anteil.

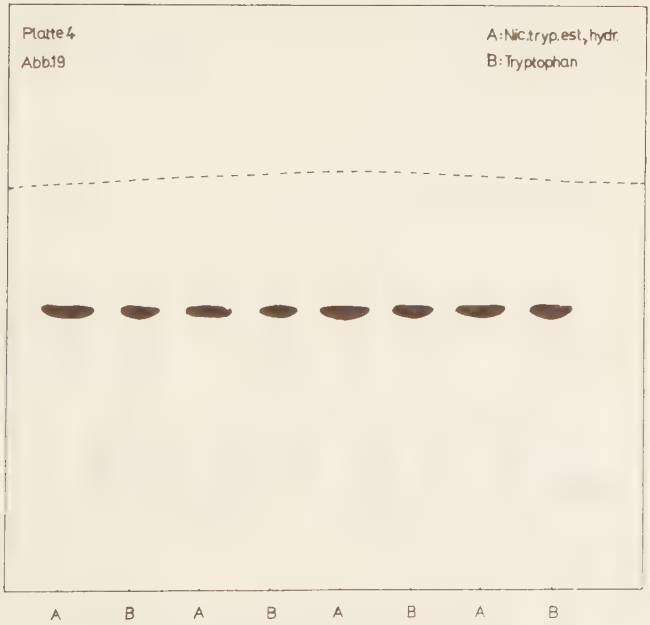
S-Bzl.-L-cyst.est. als Vergleichssubstanz zeigt zwei Farbflecke (R_f = 0,711 und 0,917). Der kleinere, schwächere entspricht dem des S-Benzyl-L-cysteins. Das Nic.S-bzl.cyst. rib. ruft nur eine schwache Färburg bei R_f=0,722 hervor, die dem des R_f-Wertes für S-Bzl.L-cyst. (R_f = 0,696) annähernd entspricht (Platte 16).

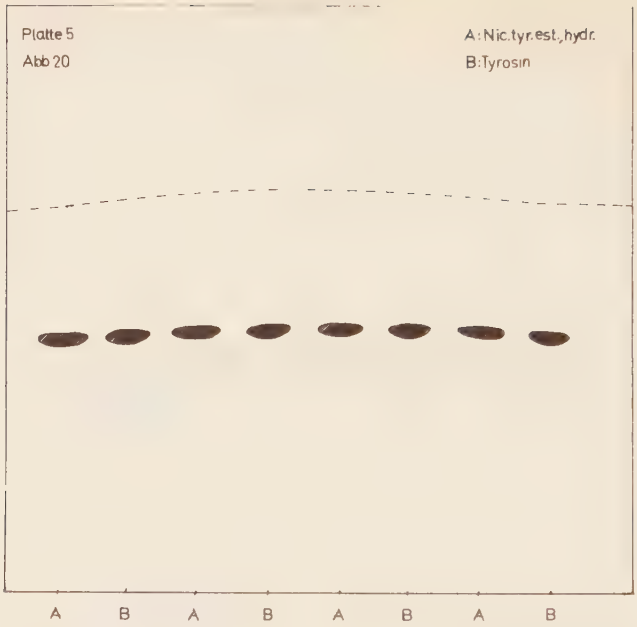
Das rebenzoylierte und das normale Nic.gly.rib. zeigen die gleichen Aminosäurefarbflecke mit den gleichen R_f-Werten, die mit denen der reinen Aminosäure Glycin verglichen werden. Daraus kann geschlossen werden, daß das hydrolysierte, rebenzoylierte Produkt mit dem normal hergestellten weitgehend übereinstimmt (Platte 14).

Platte 1
Abb 16
A: hydr. Nic gly est.
B: Given
A B A B A B A B

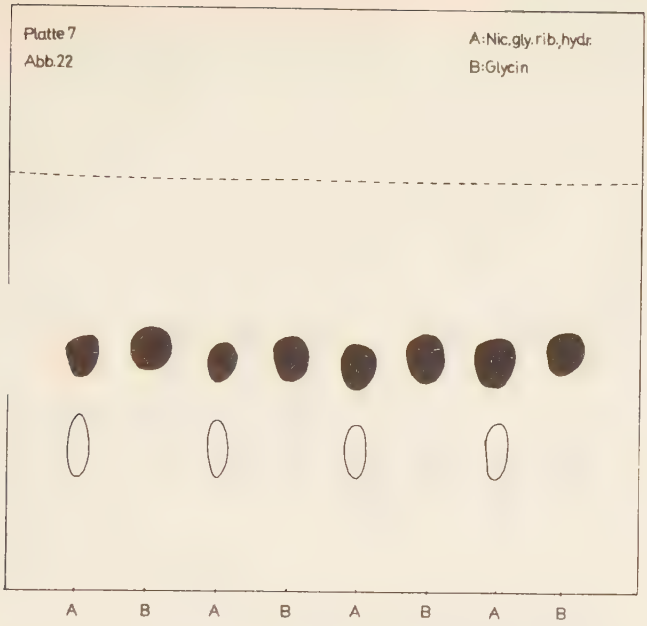
Platte 2
Abb 17
A: hydr. Nic. met. est.
B: Methanol
A B A B A B A B

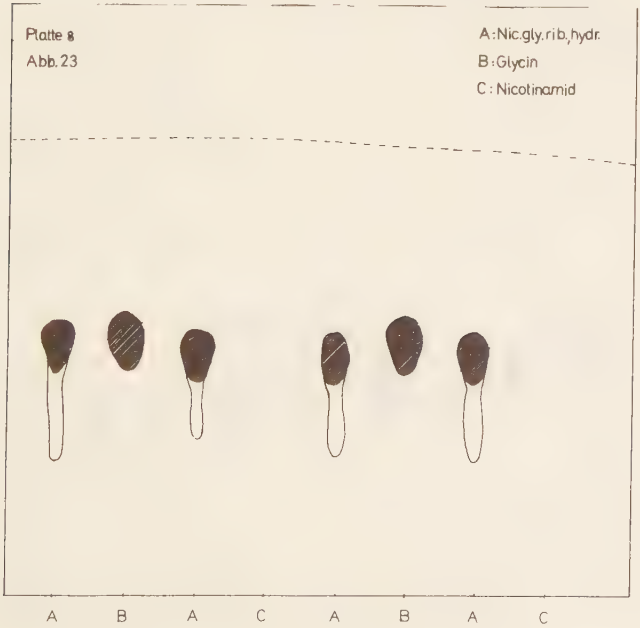
Platte 3
Abb. 18
A: Nic.S-bzl.cys.est., hydr.
B: Cystein
A B A B A B A B

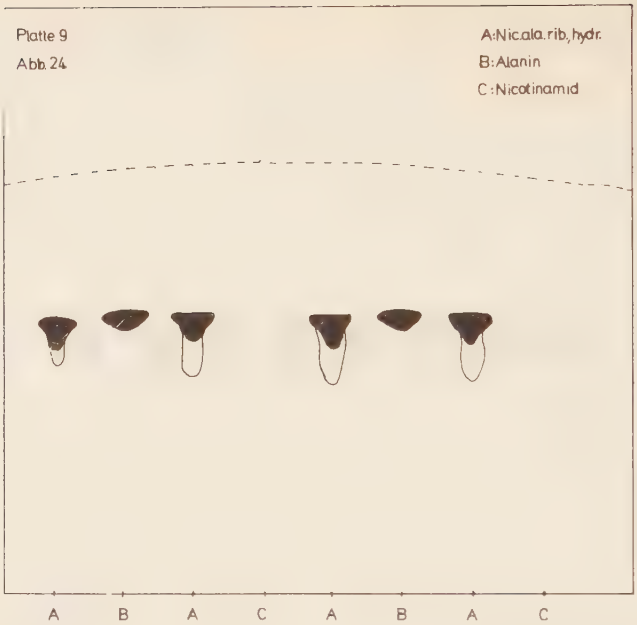

Platte 4
Abb. 19
A: Nic.tryp.est., hydr.
B: Tryptophan
A B A B A B A B

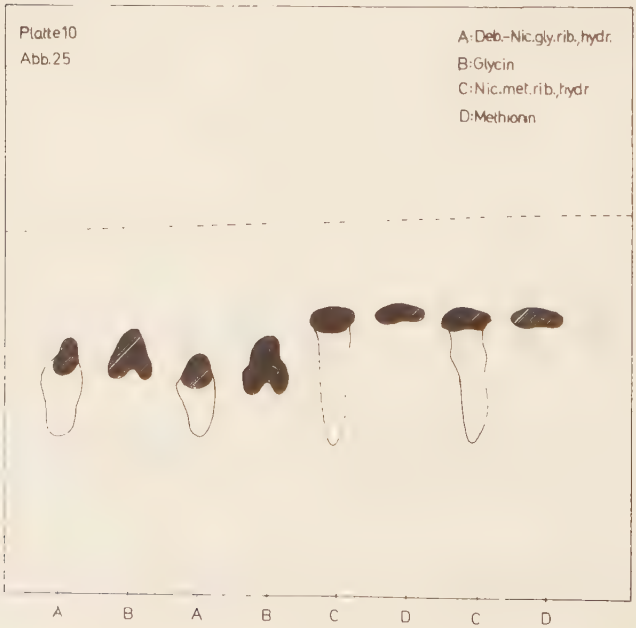

Platte 5
Abb 20
A: Nic.tyr.est., hydr.
B: Tyrosin
A B A B A B A B

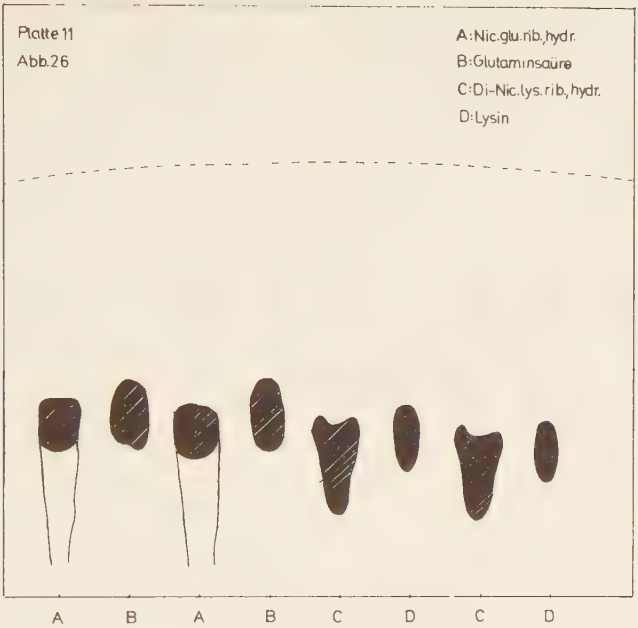
Platte 6
Abb.21
A: Di-Nic.lys.est., hydr.
B: Lysin
A B A B A B A B

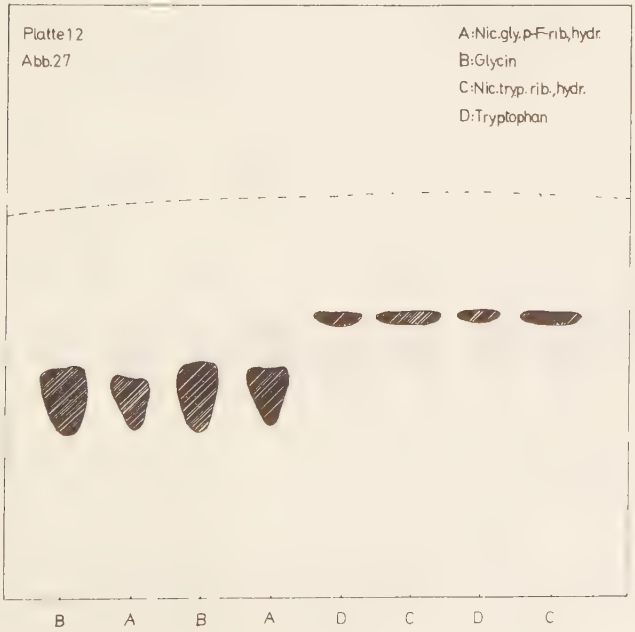

Platte 7
Abb. 22
A: Nic. gly. rib. hydr.
B: Glycin
A B A B A B A B

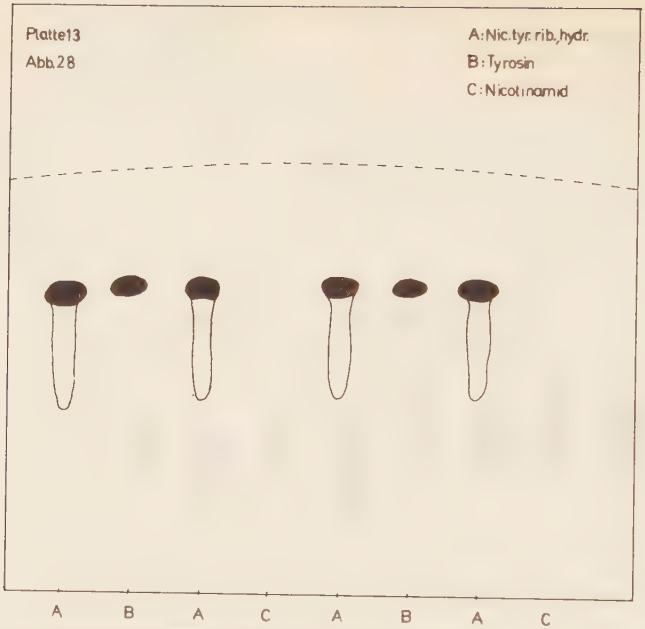

Platte 8
Abb. 23
A: Nic. gly. rib. hydr.
B: Glycin
C: Nicotinamid
A B A C A B A C


Platte 9
Abb. 24
A: Nic.ala.rib, hydr.
B: Alanin
C: Nicotinamid
A B A C A B A C

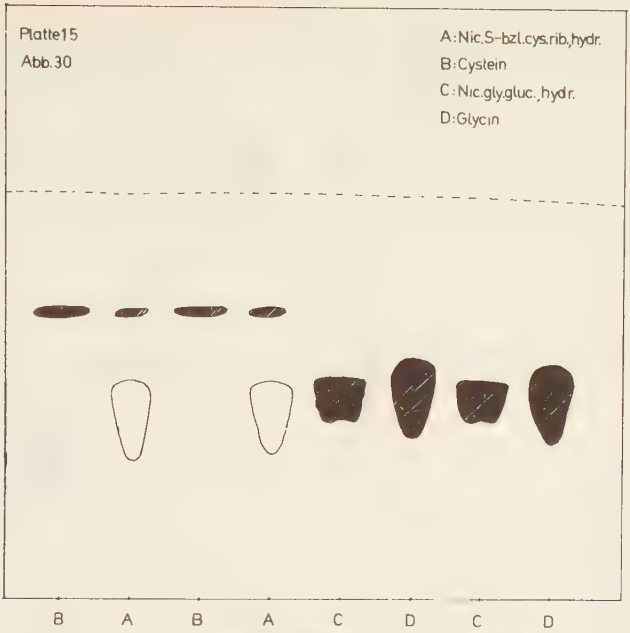

Platte 10
Abb. 25
A: Deb.-Nic.gly.rib, hydr.
B: Glycin
C: Nic.met.rib, hydr
D: Methionin
A B A B C D C D

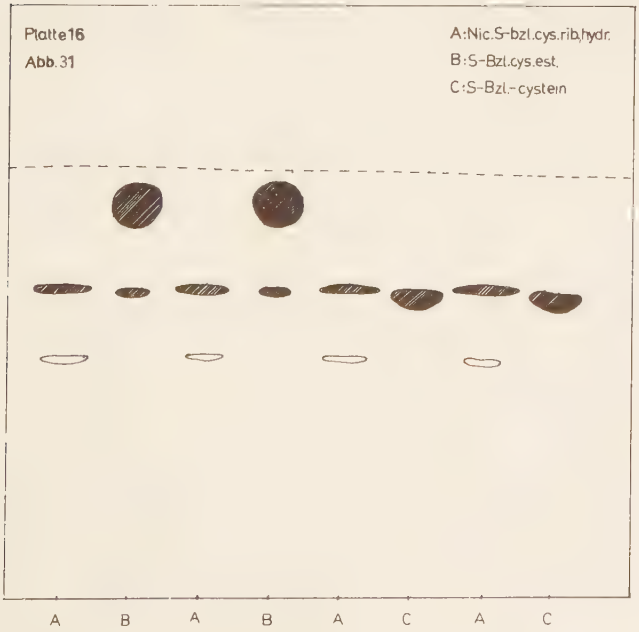

Platte 11
Abb.26
A:Nic.glu.rib,hydr.
B:Glutaminsäure
C:Di-Nic.lys.rib,hydr.
D:Lysin
A B A B C D C D


Platte 12
Abb.27
A:Nic.gly.p-F-rib,hydr.
B:Glycin
C:Nic.tryp.rib.,hydr.
D:Tryptophan
B A B A D C D C


Platte13
Abb.28
A:Nic.tyr. rib.,hydr.
B:Tyrosin
C:Nicotinamid
A B A C A B A C

Platte14
Abb.29
A:Reb.Nic.gly.rib.,hydr.
B:Nic.gly.rib.,hydr.
C:Glycin
A C A C B C B C


Platte15
Abb.30
A:Nic.S-bzl.cys.rib,hydr.
B:Cystein
C:Nic.gly.gluc.,hydr.
D:Glycin
B A B A C D C D


Platte16
Abb.31
A:Nic.S-bzl.cys.rib,hydr.
B:S-Bzl.cys.est.
C:S-Bzl.-cystein
A B A B A C A C

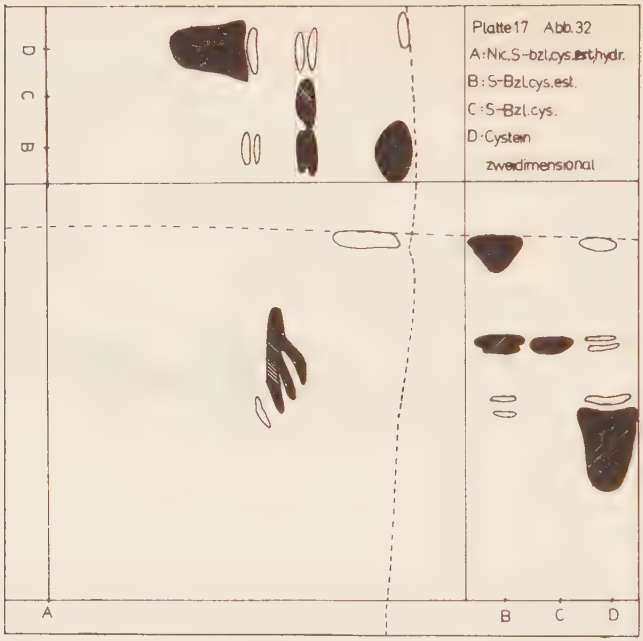

Platte 17 Abb. 32
A: Nic.S-bzl.cys.est.hydr.
B: S-Bzl.cys.est.
C: S-Bzl.cys.
D: Cystein
zweidimensional
D
C
B
A
B
C
D

Tabelle 8: R_f-Werte der hydrolysierten Nicotinylaminosäureester

Platte Nr.	hydrolysierte Produkte	Vergleichs-substanzen	R_f-Werte
1.	Nic.gly.est.		0,545
		Glycin	0,532
2.	Nic.met.est.		0,674
		Methionin	0,672
3.	Nic.S-bzl.cys.est.		0,674
			0,607
		Cystein	0,521
4.	Nic.tryp.est.		0,681
		Tryptophan	0,679
5.	Nic.tyr.est.		0,654
		Tyrosin	0,651
6.	Di -Nic.lys.est.		0,313
		Lysin	0,313

Tabelle 9: R_f-Werte der hydrolysierten Nucleosid-Derivate

7.	Nic.gly.rib.		0,571
		Glycin	0,585
8.	Nic.gly.rib.		0,556
		Glycin	0,570
		Nicotinamid[1)]	-
9.	Nic.ala.rib.		0,630
		Alanin	0,646
		Nicotinamid	-
10.	Nic.met.rib.		0,743
		Methionin	0,747
10.	Deb.Nic.gly.rib.		0,641
		Glycin	0,639

Tabelle 9: R_f-Werte der hydrolysierten Nucleosid-Derivate

Platte Nr.	hydrolysierte Produkte	Vergleichs-substanzen	R_f-Werte
11.	Nic.glu.rib.		0,391
		Glutaminsäure	0,403
11.	Di-Nic.lys.rib.		0,325
		Lysin	0,319
12.	Nic.gly.pF-rib.		0,494
		Glycin	0,449
12.	Nic.tryp.rib.		0,691
		Tryptophan	0,696
13.	Nic.tyr.rib.		0,718
		Tyrosin	0,717
		Nicotinamid[1)]	-
14.	Reb.Nic.gly.rib.		0,574
	Nic.gly.rib.		0,519
		Glycin	0,498
15.	Nic.S-bzl.cys.rib.		0,710
		Cystein	0,707
15.	Nic.gly.gluc.		0,485
		Glycin	0,452
16.	Nic.S-bzl.cys.rib.		0,722
		S-Bzl.cys.est	0,917
			0,711
		S-Bzl.cystein	0,692

1) Nicotinamid zeigte keine R_f - Werte.

5.3.4. Molgewichtsbestimmung

Es wurden ferner die Molgewichte der benzoylierten Nucleosid-Derivate (Tab.4+5) mit Hilfe eines Dampfdruck-Osmometers nach Knaur bestimmt, indem die Temperatur-Differenz zweier, in einem mit den Lösungsmitteln gesättigten Zylinder-Hohlraum befindlichen Thermistoren durch Auftropfen der Analysenlösung auf den einen und der Vergleichslösung auf den anderen Thermistor thermoelektrisch über ein Temperatur-Meßgerät, das mit einem Potentiometer und Galvanometer ausgerüstet ist, gemessen. Die vier Vergleichslösungen (Acetanilid in Chloroform oder Essigester) sind 0,01 bis 0,04 molal: 0,0135 g Acetanilid/10 g Lösungsmittel, 0,0270 g/10 g; 0,0405 g/10 g; 0,0504 g/10 g werden mit vier Analysenlösungen eines dieser Nucleosid-Derivate in gleichen Lösungsmitteln, bei gleichen Temperaturen und Empfindlichkeitswerten des Meßinstruments und vor allem bei gleichen Konzentrationen in g/10 g Lösungsmittel verglichen. Aus den Differenzen der Skalenteile des Potentiometers, abgeleitet aus den Meßwerten der Analysen- und Vergleichslösungen, wurden mit Hilfe des bekannten Molgewichts des Acetanilids (M: 135,17) als Vergleichssubstanz die Molgewichte der Nucleosid-Derivate berechnet. Die Werte werden in den Tabellen 4 und 5 wiedergegeben.

5.4. Beschreibung der Reaktionsprodukte

5.4.1. Beschreibung der Nicotinylaminosäureester

Die schon oben aufgezählten acht Nicotinylaminosäureester (XLVa-h) wurden nur der Elementaranalyse und der Dünnschichtchromatographie unterzogen. Die Analysenwerte der Elementaranalyse (C-, H-, N- und auch S-Bestimmung) stimmen mit den errechneten Werten im allgemeinen gut überein (Tab. 3), wobei leichte Abweichungen auf das Vorhandensein von Lösungsmittelresten zurückzuführen sind. Die Untersuchungen der Eigenschaften ergeben für die einzelnen Verbindungen folgende Ergebnisse:

1.) Nic.gly.est. ist eine weiße bis leicht gelbliche Substanz mit einem Schmelzpunktbereich von 53 - 55°C, die etwas schmierig und weich ist und beim Einengen aus der Lösung strahlenförmig auskristallisiert. Diese ist mittelmäßig löslich in Wasser, gut löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Essigester, Dichlormethan, Acetonitril, Pyridin und Aceton, dagegen unlöslich bis schwerlöslich in Äther, Petroläther, Toluol und Benzol. Die Ergebnisse der Elementaranalyse stimmen mit den berechneten Werten gut überein. Die Dünnschichtchromatographie zeigt eine Abspaltung des Glycins an. Dieses Produkt wurde als Bezugssubstanz der IR-spektroskopischen Untersuchung für die Nicotinylaminosäureester gewählt.

2.) Nic.ala.est. ist dagegen eine schwieriger zur Kristallisation zu bringende Substanz, die weiche und leicht schmierige Kristalle gibt. Der Schmelzpunktbereich liegt bei 48 - 50°C und das Aussehen ist etwas gelblich. Diese Substanz ist wenig löslich in kaltem H_2O, leichter in heißem und leicht löslich in Methanol, Äthanol, Pyridin und Aceton, schwer löslich in Chloroform, Essigester, Dichlormethan und Acetonitril und unlöslich in Äther, Petroläther, Benzol und Toluol.

3.) Nic.met.est. ist ebenfalls eine Substanz, die sehr weiche Kristalle von leicht gelblicher Farbe und einem Schmelzpunktbereich von 57 - 60°C gibt. Diese sind wenig löslich in kaltem, leichter in heißem H_2O, leicht löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Dichlormethan, Aceton, Acetonitril, Pyridin, Essigester, schwerer löslich in Benzol, Toluol und unlöslich in Äther und Petroläther.

4.) Nic.S-bol.cys.est. ergibt ein feinkristalliges Pulver mit dem Schmelzpunktbereich von [illegible] - 119°C. Der erhaltene Stickstoffwert der Elementaranalyse liegt etwas zu [illegible] die oberhalb der R_F-Werte der Vergleichssubstanz Cystein liegt. Ein zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm, in dem als Vergleichssubstanzen neben Cystein auch S-Benzyl-L-cysteinäthylester und S-Benzyl-L-cystein aufgetragen wurden, zeigt Farbflecke, die mit denen des S-Benzyl-L-cystein-

äthylesters annähernd übereinstimmen.

Die Verbindung ist unlöslich in kaltem, leicht löslich in heißem H_2O, leicht löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Dichlormethan, Acetonitril, Pyridin, Aceton und Essigester, schwer löslich in Benzol und Toluol und unlöslich in Äther und Petroläther.

5.) Nic.tryp.est. ist ein gelbes bis braunes Pulver von feinkristalliner Beschaffenheit, das leicht zusammenbackt und dessen Schmelzpunktbereich bei 123 - 124°C liegt. Die Substanz ist unlöslich in kaltem Wasser, mäßig löslich in heißem, dagegen leicht löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Dichlormethan, Acetonitril, Pyridin, Aceton und Essigester, wenig löslich in Benzol, Toluol und Äther, unlöslich in Petroläther.

6.) Nic.tyr.est. ist ein gelbes, feinkristallines Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 143 - 144°C, das in kaltem Wasser unlöslicher, in heißem löslicher und gut löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Pyridin und Aceton, dagegen unlöslich in Äther, Benzol, Toluol, Dichlormethan, Acetonitril und Petroläther ist.

7.) Di-Nic.lys.est. ist ein weißes bis gelbliches feinkristallines Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 57 - 60°C, das leicht zusammenbackt; ist mittelmäßig loslich in kaltem Wasser, gut löslich in heißem Wasser, in Methanol, Äthanol, Pyridin, Chloroform, schwerer loslich in Essigester, Dichlormethan, Acetonitril und Aceton, dagegen unlöslich in Äther, Petroläther, Benzol und Toluol.

8.) Nic.glu.est. ist ein braunes Öl, das unter Zersetzung siedet.

5.4.2. Beschreibung der benzoylierten Nucleosid-Derivate

Zunächst werden sechs benzoylierte Nucleosid-Derivate beschrieben, deren Analysenwerte der Elementaranalyse (C-, H-, N- und Halogen-Bestimmung) mit den berechneten Werten in guter Übereinstimmung stehen. Daraus kann auf größere Reinheit der Substanz geschlossen werden. Das wird auch

durch ein positives Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung bestätigt.

1.) N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid ist ein weißes, feinkristallines Pulver, das etwas hygroskopisch ist und einen Schmelzpunktbereich von 85 - 95°C besitzt. Es zersetzt sich beim Schmelzen und ist schwer löslich in kaltem, leichter löslich in warmem Wasser, schwer löslich in Benzol, dagegen gut in Methanol, Äthanol, Aceton, Chloroform, Essigester und Acetonitril.

Die qualitativen Nachweise auf Kohlenhydrate ergeben bei der Molisch-Probe eine positive Reaktion, d.h. die Bildung eines blauen Ringes an der Grenzfläche Lösung/konz. H_2SO_4, bei der Tollens-Probe eine kurzzeitige bläuliche Färbung der Lösung nach längerem Erhitzen im kochenden Wasserbad und bei der Seliwanow-Probe nur eine schwache positive Reaktion durch eine schwache Rotfärbung der Lösung nach längerem Erhitzen.

Die qualitative Reaktion auf Chloridionen ist positiv; die quantitative Bestimmung ergab für eine eingesetzte Substanzmenge von 0,0001 Mol (70,7 mg) eine verbrauchte Menge von 11,9 ml 0,01 n $AgNO_3$, die einer Menge von 0,0001 Mol Chloridionen annähernd äquivalent ist (M: 707,2).

Die Bestimmung abspaltbarer, funktioneller Gruppen des Moleküls mit 0,1 n NaOH ergab durch Rücktitration mit 0,1 n H_2SO_4, daß 3,75 ml von 10 ml zugesetzter 0,1 n NaOH verbraucht wurden, die bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz der Abspaltung von 3 - 4 funktionellen Gruppen äquivalent sind.

Das erhaltene Molgewicht von 690, gemessen in Essigester und Chloroform, ist dem berechneten von 707,2 annähernd gleich. Die Werte der Elementaranalyse sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Für die IR-Spektroskopie wurde diese Substanz auf Grund der guten Analysenergebnisse als Bezugssubstanz gewählt und wird auf Seite 83 diskutiert.

2.) N - [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid ist ein braunes, durch-

sichtiges, amorphes Produkt, das sich unter Erweichen bei höheren Temperaturen zersetzt. Es ist kaum löslich in kaltem, dagegen leichter löslich in heißem Wasser, wenig löslich in Benzol, besser in Essigester und gut löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Aceton und Acetonitril.

Der qualitative Nachweis auf Kohlenhydrate ergab bei der Molisch-Probe eine schnelle Bildung des blauen Ringes an der Grenzfläche Säure/Lösung, eine nur kurzzeitige schwache Blaufärbung der Lösung bei der Tollens-Probe und eine schwach rötliche Färbung der Lösung bei der Seliwanow-Probe.

Die qualitative Reaktion auf Chloridionen ist mit $AgNO_3$ positiv. Die quantitative Chloridbestimmung ergab bei einer eingewogenen Menge von 0,0001 Mol Analysensubstanz einen 0,01 n $AgNO_3$-Verbrauch, der 11,95 ml beträgt und einer ca. 0,00015 Mol Chloridmenge äquivalent ist.

Die quantitative Bestimmung auf abspaltbare Gruppen mit einer angewandten Substanzmenge von 0,0001 Mol und unter Einwirkung von 10 ml 0,1 n NaOH ergab einen Verbrauch von 3,55 ml 0,1 n NaOH, die der Abspaltung von 3 - 4 Gruppen entspricht.

Das ermittelte Molgewicht beträgt 677, gemessen in Chloroform, und liegt unter dem berechneten von 799,3.

3.) N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglutaminsäure-diäthylester-N^1-chlorid ist eine feste, durchsichtige, hellbraune und amorphe Substanz, die im Temperaturbereich von 40 - 45°C erweicht und bei höherer Temperatur unter Zersetzung schmilzt. Ein fester Schmelzpunkt ist nicht vorhanden. Diese Substanz ist etwas löslich in kaltem Wasser, besser löslich in heißem Wasser, Methanol, Äthanol, Essigester und Benzol und gut löslich in Chloroform, Acetonitril und Aceton.

Die qualitativen Nachweise auf Kohlenhydrate zeigen bei der Molisch-Probe einen nur schwachen blauen Farbstoffring an der Grenzfläche Lösung/Säure, bei der Tollens-Probe kei-

ne Reaktion und bei der Seliwanow-Probe wie bei der vorhergehenden Verbindung eine schwache Rotfärbung. Die geringere Reaktionsfähigkeit dieser Verbindungen ist auf eine Beeinflussung des Ribose-Moleküls teils durch die anderen sehr großen Molekülteile, insbesondere durch die Benzoylgruppen am Ribose-Teil, zurückzuführen. Dadurch wird offenbar die Furfuralbildung durch H_2O-Abspaltung und damit die Farbstoffbildung gehemmt.

Die qualitative Reaktion auf Chloridionen mit $AgNO_3$ verläuft positiv. Die quantitative Chloridbestimmung ergab eine für 0,0001 Mol-Einwaage annähernd äquivalente Menge Chloridionen, die 11,55 ml 0,01 n $AgNO_3$ verbraucht.
Die quantitative Bestimmung mit 0,1 n NaOH auf funktionelle, abspaltbare Gruppen ergab, daß drei bis vier Gruppen erfaßbar sind, die dem Verbrauch von 3,70 ml 0,1 n NaOH von 10 ml zugegebener entsprechen.

Das erhaltene Molgewicht beträgt 688, gemessen in Chloroform, das berechnete 807,27.

4.) N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid ist ein hellbraunes bis gelbes feinkristallines Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 105 - 125°C, das unter Zersetzung schmilzt.
Es ist wenig löslich in kaltem Wasser, besser in heißem Wasser, gut löslich in Aceton, Acetonitril, Methanol, Äthanol und Chloroform, dagegen unlöslich in Essigester und Benzol.

Die qualitativen Nachweise auf Kohlenhydrate geben für die Molisch-Probe eine Blaufärbung der gesamten oberen Schicht, der Lösungsschicht, und einen blauen Ring an der Grenzfläche Säure/Lösung; für die Tollens-Probe eine schwache Blaufärbung der Lösung und eine starke Rotfärbung für die Seliwanow-Probe, was auf eine stärkere Reaktionsfähigkeit des Moleküls schließen läßt.

Der qualitative Nachweis auf Chlorid war positiv, der quantitative mit 0,01 n $AgNO_3$ ergab bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 11,4 ml, die annähernd einer äquivalenten Menge von 0,0001 Mol Chlorid-

ionen entsprechen.

Das erhaltene Molgewicht beträgt 752, gemessen in Chloroform, das berechnete 836,31.

Die Bestimmung auf funktionelle, abspaltbare Gruppen zeigt, daß bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz 3,85 ml 0,1 n NaOH verbraucht wurden, die der Abspaltung von etwa 4 Gruppen entsprach.

5.) N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] - nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid ist ein weißes, feinkristallines Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 90 - 95°C, das unter Zersetzung schmilzt und in kaltem Wasser weniger gut, besser in heißem Wasser löslich ist. Dagegen ist es gut löslich in Methanol, Äthanol, Essigester, Chloroform, Aceton, Benzol und Acetonitril.

Die Kohlenhydrat-Nachweise ergaben für die Molisch-Probe einen blauen Ring an der Grenzfläche Säure/Lösung, für die Tollens-Probe keine Reaktion und für die Seliwanow-Probe eine starke Rotfärbung.

Die qualitative Reaktion auf Chloridionen ist positiv. Die quantitative Bestimmung auf Chloridionen ergab bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 13,05 ml 0,01 n $AgNO_3$, der annähernd einer äquivalenten Menge Chlorid entspricht.

Die quantitative Bestimmung auf abspaltbare, funktionelle Gruppen ergab bei einer angewandten Menge von 10 ml 0,1 n NaOH einen Verbrauch von 3,55 ml 0,1 n NaOH, die der Abspaltung von drei bis vier abspaltbaren Gruppen entspricht.

Das erhaltene Molgewicht beträgt 750, das berechnete 761,13 (gemessen in Chloroform).

6.) N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] - nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid ist ein graues bis hellbraunes Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 100 - 115°C, das unter Zersetzung schmilzt und in kaltem Wasser wenig, in heißem Wasser und in Benzol mehr löslich ist. Wenig löslich ist die Substanz auch in Essigester, gut löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Aceton und

Acetonitril.

Die qualitativen Nachweisreaktionen für Kohlenhydrate zeigen für die Molisch-Probe einen blauen Ring an der Grenzfläche Lösung/Säure, für die Tollens-Probe keine Reaktion und bei der Seliwanow-Probe eine mittelstarke Rotfärbung der Lösung.

Der qualitative Nachweis auf Chlorid verläuft mit $AgNO_3$ positiv, der quantitative ergab bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 12,8 ml 0,01 n $AgNO_3$, der annähernd 0,0001 Mol Chlorid entspricht.

Die quantitative Bestimmung auf abspaltbare, funktionelle Gruppen mit 0,1 n NaOH ergab bei Zugabe von 10 ml 0,1 n NaOH einen Verbrauch von 4,25 ml 0,1 n NaOH, der einer Abspaltung und Neutralisation von vier funktionellen Gruppen entspricht.

Das ermittelte Molgewicht beträgt 802, gemessen in Chloroform, das berechnete 841,29.

Die Werte der Elementaranalysen und die Molgewichte sind in der Tabelle 4 wiedergegeben. Die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Analysen in den Tabellen 6 und 7.

Die folgenden vier beschriebenen Verbindungen zeichnen sich dadurch aus, daß sie trotz umständlicher und mühsamer Reinigungsverfahren, die viele Vorversuche benötigten, nicht rein erhalten werden konnten. Die Werte der Elementaranalysen und der Molgewichtsbestimmungen zeigen daher von den berechneten mehr oder weniger starke Abweichungen.

1.) N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid bildet ein feinkristallines Pulver von gelblicher Färbung, das nach einiger Zeit zusammensintert und bei Erwärmen im Bereich von 70 - 80°C unter Zersetzung schmilzt. Die Substanz ist mäßig löslich in kaltem Wasser, besser in heißem. Wenig löslich ist diese auch in Benzol und Essigester, gut löslich in Methanol, Äthanol, Chloroform, Aceton und Acetonitril.

Die qualitativen Nachweise für Kohlenhydrate ergaben eine

positive Reaktion für die Molisch-Probe, die aber einen schwächeren blauen Ring ergab als der des Nic.gly.rib., ferner eine kurzzeitige Blaufärbung bei der Tollens-Probe und eine schwächere Rotfärbung der Lösung durch die Seliwanow-Probe.

Die qualitative Bestimmung auf Chlorid zeigte eine positive Reaktion, die quantitative ergab bei einer eingesetzten Substanzmenge von 0,0001 Mol einen Verbrauch von 16,7 ml 0,01 n $AgNO_3$, der äquivalent einer Menge von 0,00015 Mol Chlorid ist.

Die quantitative Bestimmung auf abspaltbare Gruppen ergab für diese Verbindung bei einer Einwaage von 0,0001 Mol einen Verbrauch von 4,05 ml 0,1 n NaOH von eingesetzten 10 ml. Diese verbrauchte NaOH-Menge ist äquivalent vier abgespaltener Gruppen.

Das erhaltene Molgewicht beträgt 540, gemessen in Chloroform, das berechnete 721,18.

2.) N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid bildet eine amorphe Substanz von brauner Farbe, die einen Schmelzpunktbereich von 50 - 60°C besitzt. Es ist wenig löslich in kaltem Wasser, mehr in heißem, dagegen gut löslich in Methanol, Äthanol, Aceton und Acetonitril.

Die qualitativen Nachweise für Kohlenhydrate ergeben bei der Molisch-Probe einen schwachen blauen Ring, bei der Tollens-Probe keine Reaktion und bei der Seliwanow-Probe nur eine schwache Rotfärbung der Lösung.

Die qualitative Bestimmung auf Chlorid mit $AgNO_3$ ist positiv, die quantitative ergibt bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 12,25 ml 0,01 n $AgNO_3$, der einer Menge von annähernd 0,0001 Mol Chlorid äquivalent ist.

Die quantitative Bestimmung auf abspaltbare Gruppen mit 0,1 n NaOH zeigt bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 3,85 ml 0,1 n NaOH von 10 ml, der einer Abspaltung von ca. vier Gruppen im Molekül entspricht.

Das erhaltene Molgewicht beträgt 584, gemessen in Chloroform und Essigester, das berechnete 843,37.

3.) N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyltyrosinäthylester-N^1-chlorid gibt ein hellgelbes, feinkristallines Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 95 - 100°C, das unter Zersetzung schmilzt. Es ist kaum löslich in kaltem Wasser, etwas mehr in heißem Wasser, wenig löslich auch in Essigester, Chloroform und Benzol und gut löslich in Methanol, Äthanol, Aceton und Acetonitril.

Die qualitativen Nachweise für Kohlenhydrate geben bei der Molisch-Probe einen schwachen blauen Ring, bei der Tollens-Probe keine Reaktion, dagegen bei der Seliwanow-Probe eine starke Rotfärbung der Lösung.

Die qualitative Bestimmung auf Chlorid mit $AgNO_3$ ist positiv; die quantitative zeigt bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 13,3 ml 0,01 n $AgNO_3$, der einer Menge von ca. 0,0001 Mol Chlorid entspricht.

Die quantitative Bestimmung auf abspaltbare Gruppen gibt bei gleicher Einwaage einen Verbrauch von 3,85 ml 0,1 n NaOH, der annähernd der Abspaltung von vier Gruppen des Moleküls entspricht.

Das Molgewicht wurde mit 800 in Chloroform ermittelt, das berechnete beträgt 813,28.

4.) Di- {N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl } -lysinäthylester-di-N^1-chlorid ist ein weißes, feinkristallines Pulver mit einem Schmelzpunktbereich von 95 - 105°C, das ebenfalls unter Zersetzung schmilzt und kaum löslich in Wasser, Essigester, Aceton und Benzol, wenig löslich in Methanol, Aceton, Acetonitril und Chloroform ist. Die Nachweise für Kohlenhydrate ergeben bei der Molisch-Probe einen starken blauen Ring. Die Tollens-Probe ist dagegen negativ und die Seliwanow-Probe führt zu einer starken Rotfärbung der Lösung.

Der qualitative Nachweis auf Chlorid ist positiv, der quantitative ergibt bei einer Einwaage von 0,00005 Mol Substanz einen Verbrauch von 12,6 ml 0,01 n $AgNO_3$. Das entspricht einer Menge von ca. 0,0001 Mol Chlorid, d.h. auf 1 Molekül

der Substanz zwei Atome Chlor, da diese Verbindung zwei Nicotinylgruppen besitzt.

Der quantitative Nachweis von abspaltbaren Gruppen bei einer Einwaage von 0,00005 Mol ergibt bei einer zugeführten Menge von 10 ml 0,1 n NaOH einen Verbrauch von 3,6 ml 0,1 n NaOH, das sieben abspaltbaren Gruppen äquivalent ist, da dieses Molekül zwei Nicotinylaminosäureester und zwei Kohlenhydrat-Teile, die benzoyliert sind, besitzt.

Das Molgewicht wurde mit 875 in Chloroform ermittelt, das berechnete beträgt 1364,29.

Durch Vergleich der erhaltenen Analysenwerte der qualitativen und quantitativen analytischen Bestimmungen und der IR-Absorptionsspektren der auf Seite 76 angegebenen kristallinen Substanzen kann man auf einen gleichen Aufbau der Moleküle nach der Formel auf Seite 56 schließen. Das gilt auch für die vier, nicht rein erhaltenen Substanzen, deren Konstitution aber durch die Spektralanalyse bestätigt wird. Aus Zeitmangel wurden weitere Reinigungsversuche dieser vier Verbindungen unterlassen, da sie für die Versuche an Insekten rein genug sind. Im Vergleich zu den reinen Verbindungen zeigen diese bei der quantitativen Chloridbestimmung einen zum Teil höheren Verbrauch an 0,01 n $AgNO_3$ und bei der Bestimmung auf abspaltbare Molekülgruppen einen teilweise höheren 0,1 n NaOH-Verbrauch, der auf eine größere Zahl abspaltbarer Gruppen schließen läßt oder auf Aminosäureester, die als Verunreinigungen vorhanden sind.

Eine Sonderstellung nimmt die Verbindung N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid, die durch Debenzoylierung der Verbindung N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid entsteht. Es ist ein braunes, sehr hygroskopisches Pulver, das im Schmelzpunktbereich von 50 - 60°C unter Zersetzung schmilzt. Es ist gut löslich in Wasser und Methanol, dagegen unlöslich in Essigester, Aceton, Acetonitril, Benzol und Chloroform.

Die qualitativen Nachweisreaktionen zeigen bei der Molisch-Probe eine schnelle Bildung eines blauen Ringes, der stark ausgeprägt ist, bei der Tollens-Probe eine bläuliche Färbung der Lösung und bei der Seliwanow-Probe eine mittelstarke Rotfärbung. Im ganzen ist das Molekül ohne diese Benzoylgruppen reaktionsfähiger.

Die qualitative Chloridbestimmung ist positiv, die quantitative ergibt bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz einen Verbrauch von 12,8 ml 0,01 n $AgNO_3$, der annähernd 0,0001 Mol Chlorid äquivalent ist. Die ungenauen Elementaranalysenergebnisse deuten auf Verunreinigungen hin, die trotz Umfällens und Umkristallisierens nicht beseitigt werden können.

Zum Beweis dieser Verbindung wurde eine bestimmte Menge des debenzoylierten Produktes N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid mit Benzoylchlorid in Pyridinlösung rebenzoyliert. Das erhaltene Produkt Reb.Nic.gly.rib. erweist sich als ein graues Pulver, das im Schmelzpunktbereich 101 - 104°C unter Zersetzung schmilzt. Es zeigt die Löslichkeit des Nic.gly.rib.-Ausgangsproduktes und gibt bei der Molisch-Probe eine schwache positive Reaktion, d.h. die Bildung eines blauen Ringes an der Grenzfläche Lösung/konz. H_2SO_4, bei der Tollens-Probe eine kurzzeitige bläuliche Färbung und bei der Seliwanow-Probe eine schwache positive Reaktion durch Rotfärbung der Lösung, beides durch Erwärmen auf dem kochenden Wasserbad.

Die qualitative Reaktion auf Cl^--Ionen ist schwach, zu gering für die Durchführung einer quantitativen Bestimmung. Die Bestimmung abspaltbarer, funktioneller Gruppen des Moleküls mit 0,1 n NaOH ergibt durch Rücktitration mit 0,1 n H_2SO_4, daß 2,9 ml von 10 ml zugesetzter 0,1 n NaOH verbraucht wurden, die bei einer Einwaage von 0,0001 Mol Substanz der Abspaltung von drei Gruppen äquivalent sind.

Die Elementaranalyse entspricht annähernd den berechneten Werten. Wegen des sehr geringen Cl^--Gehalts muß auf ein weitgehendes Fehlen des Cl^--Ions geschlossen werden. Die IR-Spektroskopie des Reb.Nic.gly.rib. zeigt eine Substanz,

deren Spektrum mit dem des Nic.gly.rib.-Ausgangsproduktes weitgehend übereinstimmt (Seite

Damit kann mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Bildung des debenzoylierten N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorids geschlossen werden, das nach der Elementaranalyse nur einen sehr geringen Cl^--Ionen-Gehalt besitzt und praktisch chlorfrei ist.

5.5. Übersicht über die gültigen Vorschriften zur Darstellung der Nicotinylaminosäureester und der definiert reinen und verunreinigten benzoylierten Nucleosid-Derivate

5.5.1. Gültige Vorschriften zur Synthese von Nicotinylaminosäureester

Für die gültige Vorschrift zur Synthese von Nicotinylaminosäureester wurde nach Vorversuchen die veränderte Vorschrift zur Darstellung von Nicotinylglycinäthylester verwendet. Diese gilt auch als Modellvorschrift zur Synthese der anderen Nicotinylaminosäureester.

Gültige Vorschrift für die Synthese von Nicotinylglycinäthylester:

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml absolutem Chloroform suspendiert. Danach werden 7,1 g (0,05 Mol) Glycinäthylesterhydrochlorid hinzugefügt und eine kurze Zeit stark gerührt. Nun kommen tropfenweise und unter Wasserkühlung 8 - 10 ml Pyridin hinzu, nach einigen Minuten nochmals die gleiche Menge. Es wird dann noch ca. 1 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Die Lösung wird dann im Schütteltrichter zweimal mit je 20 ml Wasser, 3 mal mit je 20 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und nochmal 2 mal mit je 20 ml Wasser geschüttelt und die Chloroformlösung mit Na_2SO_4 getrocknet. Dann wird diese bis zu einem dicken Sirup eingeengt und das restliche Pyridin mit Toluol abdestilliert. Der Rückstand wird nochmal in ca. 100 ml Chloroform gelöst, 5 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen,

mit Na_2SO_4 getrocknet und wieder bis zur Kristallisation eingedampft.

Ausbeute : 5,7 g Nicotinylglycinäthylester (54,7 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 53 - 55°C Lit.: 54 - 55°C

Bruttoformel: $C_{10}H_{12}N_2O_3$

C	(gefunden)	57,60 %
	(berechnet)	57,68 %
H	(gefunden)	5,90 %
	(berechnet)	5,89 %
N	(gefunden)	13,30 %
	(berechnet)	13,45 %

Molgewicht : 208,23

Die Synthesen der Nicotinylaminosäureester des Alanins, Methionins, Tryptophans, Tyrosins, Lysins, S-Benzyl-L-cysteins und der Glutaminsäure verlaufen analog und werden im speziellen experimentellen Teil wiedergegeben (Tabelle 3).

5.5.2. Gültige Vorschriften zur Synthese von benzoylierten Nucleosid-Derivaten

Die gültigen Vorschriften für die Synthese der benzoylierten Nucleosid-Derivate wurden aus einer Anzahl von Vorversuchen nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt: Diese müssen die besten Analysenergebnisse, die höchsten Ausbeuten der letzten Fraktion und einen guten, möglichst kleinen Schmelzpunktbereich aufweisen. Dazu werden besonders die letzten Fraktionen der ausgewählten Versuchsansätze, die den in Essigester löslichen Teil ergeben, hervorgehoben und gesondert tabelliert. Der Vollständigkeit halber werden auch die Fraktionen I angeführt, soweit bei diesen Ansätzen zwei Fraktionen entstehen (Tabelle 10).

5.5.2.1. Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid.

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl unter Eiskühlung ge-

sättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank bei ca. 5°C gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Es wird der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das im Vakuum dann abgedampft wird. Der sirupöse Rückstand wird in 600 ml Acetonitril gelöst und tiefgekühlt.

6,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gegeben, gelöst und der gekühlten Zuckerlösung zugegeben. Es wird mit 50 ml kaltem Acetonitril nachgespült. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen.

Nach dem Abfiltrieren vom Ausgefallenen wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit 50 ml Chloroform aufgenommen. Die ebenfalls gekühlte Chloroformlösung wird dann mit kaltem Äther langsam überschichtet und dann durch Umrühren vermischt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der im Kühlschrank stehenbleibt. Dabei kristallisiert ein kleiner Teil aus. Es wird nun das Lösungsmittel vorsichtig abdekantiert und mit kaltem Äther nachdekantiert. Der sirupöse Rückstand wird nun in ca. 50 ml Essigester gelöst, wobei ein Teil unlöslich zurückbleibt, der nicht weiterverarbeitet wird (Fraktion I). Die Essigesterlösung wird gleichfalls tiefgekühlt, mit kaltem Äther überschichtet und durch Umrühren vermischt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der nach Stehen im Kühlschrank teilweise kristallin wird.

Dieser wird abgesaugt, mit kaltem Äther ausgewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Es bleibt ein weißes, zum Teil amorphes und kristallines Pulver zurück, das hygroskopisch ist.

Für diese Vorschrift wurde die der Ansätze 30 und 40 verwendet.

Ansatz 30

Ausbeute : 5,0 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (23,73 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 90 - 95°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	61,40 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	5,70 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,10 %
	(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149

Ansatz 40

Ausbeute : 3,8 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (17,76 % d.Th.)

Schmelzpunkt: 84 - 89°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	61,18 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	5,04 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,09 %
	(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149

5.5.2.2. Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung im Vakuum eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das gleichfalls abdestilliert wird. Der sirupöse Rückstand wird anschließend in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst.

8,4 g (0,03 Mol) Nicotinylmethioninäthylester, gelöst in 100 ml Acetonitril, werden zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann nach Abfiltrieren von Verunreinigungen im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird dann in 50 ml Chloroform gelöst und abgekühlt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit kaltem absoluten Äther überschichtet. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit Äther nachdekantiert und dann in ca. 50 ml Essigester gelöst. Dabei löst sich das Produkt. Die Lösung wird wieder abgekühlt und mit kaltem Äther behandelt. Es fällt wieder ein schmieriger Niederschlag aus, der in der Kälte nur zum Teil kristallisiert. Er wird abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Die Vorschrift des Ansatzes 12 wird als die endgültige Vorschrift verwendet.

Ausbeute : 8,1 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$ (23,78 % d. Th.)

Schmelzpunkt: schmieriges Produkt

Bruttoformel:	$C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$	C	(gefunden)	57,30 %
			(berechnet)	58,60 %
		H	(gefunden)	5,70 %
			(berechnet)	5,42 %
Molgewicht :	799,312	N	(gefunden)	4,50 %
			(berechnet)	3,50 %

5.5.2.3. Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorid

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung von ausgefallenen Verunreinigungen filtriert und bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das ebenfalls verdampft wird. Dieser wird dann in 500 ml Acetonitril gelöst.

9,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglutaminsäurediäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zur obigen stark abgekühlten Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt zwei Tage im Kühlschrank stehen und wird dann filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in 100 ml Chloroform aufgenommen und stark abgekühlt. Das Produkt wird nun durch Überschichten und Vermischen mit kaltem Äther ausgefällt. Nach dem Absetzen wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Äther nachdekantiert. Danach werden ca. 50 ml Essigester hinzugegeben, worin sich der Niederschlag voll löst. Die Lösung wird wieder abgekühlt und mit Äther behandelt. Es fällt ein schmierig-öliger Niederschlag aus, der nach Absaugen im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Es wird die Vorschrift des Ansatzes 9 als endgültige Vorschrift verwendet.

Ausbeute : 13,4 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (55,03 % d. Th.)

Schmelzpunkt: sirupöses Produkt

Bruttoformel: $C_{41}H_{41}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	59,40 %
	(berechnet)	61,00 %
H	(gefunden)	5,52 %
	(berechnet)	5,37 %
N	(gefunden)	3,80 %
	(berechnet)	3,47 %
Cl	(gefunden)	5,40 %
	(berechnet)	4,34 %

Molgewicht : 807,263

5.5.2.4. Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Reaktionslösung filtriert und im Vakuum bei Zim-

mertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird dann 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das jedesmal im Vakuum abgezogen wird. Der sirupöse Rückstand wird dann in 250 ml Acetonitril gelöst.

10,2 g (0,03 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 250 ml Acetonitril kalt gelöst, zu der obigen Zuckerlösung zugegeben und mit 100 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird diese im Vakuum eingedampft und der sirupöse Rückstand in 50 ml Chloroform aufgenommen und abgekühlt. Die Lösung wird dann mit Äther überschichtet und vermischt. Dabei fällt ein Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und der Rückstand in 50 ml Essigester gelöst, wobei ein Teil ungelöst zurückbleibt (Fraktion I). Aus der Essigesterlösung wird in der Kälte die Fraktion II mit kaltem Äther gefällt, die abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Die Vorschrift des Ansatzes 5 wird als die für die endgültige Vorschrift verwendet. Es werden zwei Fraktionen erhalten.

Fraktion I (der in Essigester ungelöste Teil)

Ausbeute : 13,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 125 - 128°C C (gefunden) 61,60 %
H (gefunden) 5,00 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^{1}-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$ C (berechnet) 61,04 %
H (berechnet) 5,39 %

Molgewicht : 373,85

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 0,3 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (1,18 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 105 - 120°C

Bruttoformel: $C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	64,40 %
	(berechnet)	64,63 %
H	(gefunden)	5,50 %
	(berechnet)	5,06 %
N	(gefunden)	6,30 %
	(berechnet)	5,02 %

Molgewicht : 836,312

5.5.2.5. Darstellung von N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid

19,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose werden in 1200 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 14-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird dann nach dem Abfiltrieren von den ausgefallenen Verunreinigungen bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol gelöst, das jedesmal abdestilliert wird, und anschließend in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst.

6,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst, in der Kälte zu der Reaktionslösung gegeben und mit 50 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank, wird dann von Ausgefallenem filtriert und danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der Rückstand wird dann in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen, worin er sich vollständig löst. Dann wird die Lösung stark abgekühlt und mit kaltem Äther überschichtet und vermischt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit etwas Äther nachdekantiert, und der Rückstand anschließend mit Essigester behandelt, in dem er sich vollständig löst. Diese Lösung wird gleichfalls abgekühlt und mit kaltem Äther wie oben behandelt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Die Vorschrift des Ansatzes 3 wird als endgültige Vorschrift verwendet.

Ausbeute : 2,0 g N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (8,03 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 105 - 115°C

Bruttoformel: $C_{44}H_{39}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	63,10 %
	(berechnet)	62,82 %
H	(gefunden)	5,10 %
	(berechnet)	4,91 %
N	(gefunden)	3,20 %
	(berechnet)	3,33 %

Molgewicht : 841,29

5.5.2.6. Darstellung von N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid

16,76 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 1200 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in ca. 30 ml Benzol gelöst, das dann ebenfalls eingedampft wird. Anschließend wird er in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst und abgekühlt.
6,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen kalten Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird nach dem Abfiltrieren von Verunreinigungen im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen und stark abgekühlt. Die kalte Lösung wird dann in kalten Äther eingegossen, wobei ein weißer Niederschlag ausfällt. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit ca. 50 ml Essigester versetzt. Dabei löst sich der größte Teil auf. Der in Essigester unlösliche Teil bleibt als Fraktion I zurück. Die Essigesterlösung wird nach dem Abkühlen ebenfalls in kalten Äther eingegossen. Dabei fällt die Fraktion II aus, der in Essigester lös-

Tabelle 10: Übersicht über die Darstellung der N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylaminosäureäthylester-N^1-chloride nach der Zusammenfassung der gültigen Vorschriften:

Aminosäure	Ans. Fraktion Nr.	Acetyltribenzoylribofuranose		Acetonitril	Nicotinylaminosäureäthylester		Acetonitril	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute		Schmelzpunkte
		g	Mol	ml	g	Mol	ml		g	%	°C
Glycin	30/I	15,2	0,03	600	6,3	0,03	100	7	5,0	23,37	90-95
	40/I	15,2	0,03	600	6,3	0,03	100	7	3,8	17,76	84-89
Methionin	12/I	15,2	0,03	500	8,4	0,03	100	2	8,1	23,78	-
Glutaminsäure	9/I	15,2	0,03	500	9,3	0,03	100	2	13,4	55,03	-
Tryptophan	5/II	15,2	0,03	250	10,2	0,03	250	7	0,3	1,18	105-120
N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid											
Glycin	3/I	19,2[1]	0,03	500	6,3	0,03	100	7	2,0	8,03	105-115
N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid											
Glycin	2/II	16,8[2]	0,03	600	6,3	0,03	100	7	4,9	21,5	89-91

Zuckerkomponente: 1) = benzoylierte Glucose; 2) = fluorbenzoylierte Ribose

liche Teil, der abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Für die endgültige Vorschrift wird die des Ansatzes 2 verwendet.

Fraktion I (in Essigester unlöslicher Teil)

Ausbeute : 1,5 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 168 - 169°C

C (gefunden)	51,01 %
H (gefunden)	5,01 %
N (gefunden)	10,04 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid:

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet)	49,09 %
H (berechnet)	5,36 %
N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (in Essigester löslicher Teil)

Ausbeute : 4,9 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (21,46 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 89 - 91°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{30}ClF_3N_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,21 %
	(berechnet)	56,81 %
H	(gefunden)	4,18 %
	(berechnet)	4,24 %
N	(gefunden)	4,04 %
	(berechnet)	3,68 %
F	(gefunden)	6,63 %
	(berechnet)	7,49 %

Molgewicht : 761,125

Es folgen jetzt mehrere gültige Vorschriften, die von Vorschriften mehrerer Vorversuchsansätzen der gewünschten benzoylierten Nucleoside stammen, welche aber keine reinen Produkte ergeben. Die Analysenwerte dieser Ansätze werden mit denen der gewünschten Produkte und der entsprechenden Nicotinylaminosäureäthylester-N^1-hydrochloriden verglichen (Tabelle 11).

5.5.2.7. Darstellungsversuch von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid.

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen wird das Filtrat bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das ebenfalls im Vakuum eingedampft wird. Der Rückstand wird in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst.

6,7 g (0,03 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen kalten Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird nach der Filtration bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen. Es fällt kein Niederschlag aus. Nach dem Abkühlen der Lösung wird diese mit kaltem Äther überschichtet und vermischt, wobei ein sirupöser Niederschlag ausfällt. Nach Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Äther nachdekantiert. Der Rückstand wird nun mit ca. 50 ml Essigester behandelt, darin er sich vollständig löst. Die Essigesterlösung wird nach Abkühlen mit Äther behandelt, das ausgefallene Produkt abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Es wird die Vorschrift des Ansatzes 15 als endgültige Vorschrift verwendet.

Ausbeute : 11,1 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (51,1 % d.Th.)

Schmelzpunkt: 72 - 76°C

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,40 %
	(berechnet)	61,62 %
H	(gefunden)	5,50 %
	(berechnet)	5,17 %

Molgewicht : 721,176

Dieses Produkt ist mit Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid verunreinigt, das auch als Bezugssubstanz zur Berechnung herangezogen wird.

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid:

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$ C (berechnet) 51,07 %
H (berechnet) 5,85 %

Molgewicht : 258,714

5.5.2.8. Darstellungsversuch von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird filtriert und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das abdestilliert wird. Er wird dann in 300 ml Acetonitril gelöst.

11,5 g (0,03 Mol) Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester werden in 300 ml Acetonitril unter Erwärmen gelöst und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur zu der kalten Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 14 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in ca. 40 ml Chloroform gelöst, stark abgekühlt und das Produkt durch Eingießen in kalten Äther ausgefällt. Nach Absetzen des sirupösen Niederschlages wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und anschließend in Essigester gelöst. Die Essigesterlösung wird gleichfalls stark abgekühlt und in Äther eingegossen. Der Niederschlag wird nach dem Absetzen abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Die Vorschrift des Ansatzes 4 wird als gültige Vorschrift verwendet.

Ausbeute : 9,4 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 56 - 58°C

C (gefunden)	59,10 %
H (gefunden)	5,46 %
N (gefunden)	4,91 %
S (gefunden)	5,53 %

Analysenwerte bezogen auf die des Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-hydrochlorids:

Bruttoformel: $C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$

C (berechnet)	56,76 %
H (berechnet)	5,55 %
N (berechnet)	7,35 %
S (berechnet)	8,42 %

Molgewicht : 380,905

Bezogen auf N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (37,96%)

Bruttoformel: $C_{44}H_{41}N_2O_{10}ClS \cdot 1H_2O$

C (berechnet)	62,67 %
H (berechnet)	5,14 %
N (berechnet)	3,32 %
S (berechnet)	3,80 %

Molgewicht : 843,37

5.5.2.9. Darstellungsversuch von N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltyrosinäthylester-N^1-chlorid

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird dann von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird dann 3 mal in je 30 ml Benzol gelöst, das dann abdestilliert wird. Anschließend wird der Sirup in 250 ml kaltem Acetonitril gelöst.

9,4 g (0,03 Mol) Nicotinyltyrosinäthylester werden in 450 ml Acetonitril durch Erwärmen gelöst und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Diese Lösung wird dann zu der kalten Zuckerlösung zugegeben und bleibt 14 Tage im Kühlschrank stehen. Sie wird dann von Ausgefallenem abfiltriert

und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der sirupöse Rückstand wird dann in ca. 50 ml Chloroform gelöst. Diese Lösung wird dann stark abgekühlt und in kalten Äther eingegossen. Es fällt ein sirupöser Niederschlag aus, nach dessen Absetzen das Lösungsmittelgemisch abdekantiert wird. Danach wird dieser nochmal in Chloroform gelöst, die Lösung stark gekühlt und wieder in kalten Äther eingegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Es wird die Vorschrift des Ansatzes 2 verwendet.

Ausbeute : 14,6 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 98 - 100°C

C (gefunden)	58,27 %
H (gefunden)	5,12 %
N (gefunden)	4,89 %

Bezogen auf das Nicotinyltyrosinäthylester-N^1-hydrochlorid:

Bruttoformel: $C_{17}H_{19}ClN_2O_4$

C (berechnet)	58,20 %
H (berechnet)	5,46 %
N (berechnet)	7,98 %

Molgewicht : 350,812

Bezogen auf das N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyltyrosinäthylester-N^1-chlorid $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{43}H_{39}ClN_2O_{11} \cdot 1H_2O$

C (berechnet)	63,51 %
H (berechnet)	5,08 %
N (berechnet)	3,44 %

Molgewicht : 813,28

5.5.2.10. Darstellungsversuch von Di- {N^1- [2'.3'.5'-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl} -lysinäthylester-di-N^1-chlorid

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert, die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft und der

sirupöse Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das ebenfalls abdestilliert wird. Anschließend wird dieser in 500 ml Acetonitril aufgenommen und gelöst.

5,8 g (0,015 Mol) Di- [nicotinyl] -lysinäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der abgekühlten Zuckerlösung hinzugegeben, anschließend wird mit 100 ml Acetonitril nachgespült.Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird diese filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird mit Chloroform (ca. 50 ml) aufgenommen, abgekühlt und mit Äther in der Kälte das Produkt gefällt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit Äther nachgewaschen und der Rückstand mit Essigester behandelt, worin er sich nicht löst. Er wird nochmal in Chloroform gelöst und mit Äther ausgefällt. Das Produkt wird abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Die Vorschrift des Ansatzes 1 wird verwendet.

Ausbeute : 8,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 95 - 104°C

C (gefunden)	59,90 %
H (gefunden)	5,50 %
N (gefunden)	5,80 %

Bezogen auf das Di- [nicotinyl] -lysinäthylester-di-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_4$

C (berechnet)	52,52 %
H (berechnet)	5,73 %
N (berechnet)	12,25 %

Molgewicht : 457,374

Bezogen auf das Di- {N- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl} -lysinäthylester-di-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{72}H_{66}Cl_2N_4O_{18} \cdot 1H_2O$

C (berechnet)	63,40 %
H (berechnet)	5,03 %
N (berechnet)	4,11 %

Molgewicht : 1364,29

Tabelle 11: Übersicht über die Darstellungsversuche der N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylaminosäureäthylester-N^1-chloride

Aminosäure	Ans. Fraktion Nr.	Acetyltribenzoylribofuranose		Acetonitril	Nicotinylaminosäureäthylester		Acetonitril	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute		Schmelzpunkte
		g	Mol	ml	g	Mol	ml		g	%	°C
Alanin	15/I	15,2	0,03	600	6,7	0,03	100	2	11,1	51,1	72-76
S-Benzyl-L-cystein	4/I	15,2	0,03	300	11,5	0,03	300	14	9,4	37,96	56-57
Tyrosin	2/I	15,2	0,03	250	9,4	0,03	450	14	14,6	—	98-100
Lysin	1/I	15,2	0,03	500	5,8	0,015	100	7	8,7	—	95-104

6. Prüfung der hergestellten Verbindungen auf Wirksamkeit an Insekten

Zur Prüfung der Wirksamkeit der Nicotinylaminosäureester:

Nicotinylglycin-, alanin-,-methionin-,-tryptophan- und -S-benzyl-L-cysteinäthylester, Nicotinylglutaminsäure-diäthylester und Di-[Nicotinyl] -lysinäthylester;

und der benzoylierten Nucleosid-Derivate:

N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.rib.), -alanin-(Nic.ala.rib.), -methionin-(Nic.met.rib.), -tryptophan-(Nic.tryp.rib.), -tyrosin- (Nic.tyr.rib.), -S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid (Nic.S-bzl.cys.rib.), -glutaminsäure-diäthylester-N^1-chlorid (Nic.glu.rib.) und Di- {N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl} -lysinäthylester-N^1-chlorid (Di.Nic.lys.rib.) und N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.gluc.)

an Insekten werden diese hergestellten Verbindungen bzw. Substanzen dem Futter der Fliegen (Drosophila melanogaster) beigegeben. Daneben werden zum Vergleich auch die fluorhaltigen Verbindungen 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose und das entsprechende Nucleosid-Derivat N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.pF-rib.) auf ihre Wirksamkeit an Insekten geprüft.

Methodik: Methode I

Zu diesem Zweck werden die Zuchtgefäße in der Reihenfolge mit je 0,5 g; 0,25 g; 0,1 g oder 0,05 g der ausgewählten Verbindungen (Substanzen) versetzt. Anschließend werden die Gefäße mit je 50 g heißem Futter gefüllt, das sorgfältig mit der zu untersuchenden Substanz verrührt wird. Die Konzentration der Verbindung in dem Futter beträgt je nach der zugegebenen Menge in der obigen Reihenfolge ca. 1%; 0,5%; 0,2% oder 0,1%.

Für die Herstellung des Futters für 12 Zuchtgefäße werden 6 g Agar-Agar in 500 ml Wasser erhitzt, dann mit 1 Eßlöffel Sirup und anschließend mit 70 g Maismehl, vorher aufgequollen in 250 ml Wasser, versetzt. Bei allmählicher Zunahme der Viskosität des Futters werden 50 g heiß in die Zuchtgefäße, in denen sich die zu prüfende Substanz befindet, gefüllt und sorgfältig umgerührt.

Methode II:

Um eine feinere und bessere Verteilung der zu prüfenden Substanz im Futter zu erhalten, wird die Verbindung im Zuchtgefäß vor der Futterzugabe mit 0,5 - 1 ml reinem Äthanol gelöst. Kurz vor der Zugabe des Futters wird die Lösung mit 5 ml kaltem Wasser versetzt. Danach werden sofort 45 g heißes Futter hinzugegeben, sorgfältig gerührt und geschwenkt.

Es werden in jedes Zuchtgefäß bei beiden Methoden je 10 Fliegenpaare hineingesetzt. Nach 7 Tagen werden die alten Tiere abgeschüttelt. Die jungen Tiere schlüpfen nach etwa weiteren 7 Tagen und werden dann ausgezählt. Von jeder Substanzkonzentration werden je 2 Zuchtgefäße besetzt.

Ergebnisse der Prüfung:

Im Verlauf der Untersuchung nach der Methode I zeigte es sich, daß Nicotinylglycin- und -alaninäthylester in einer Konzentration von 0,5 g Substanz/50 g Futter (1 %) zwar die Bildung von Fliegenpuppen ermöglichen, aber daß selbst keine Fliegen mehr schlüpfen. Von den anderen Nicotinylaminosäureestern zeigen nur noch Nicotinylmethioninäthylester in dieser Konzentration (1 %) eine deutliche Verringerung der Anzahl geschlüpfter Fliegen. Die anderen Konzentrationen dieser Ester beeinflussen nicht die Vermehrung der Tiere.

Von den benzoylierten Nucleosid-Derivaten Nic.gly.rib., Nic.ala.rib., Nic.met.rib. und Di-Nic.lys.rib. üben in einer Konzentration von 0,5 g Substanz je 50 g Futter (1 %) einen negativen Einfluß auf die Vermehrung aus. Da-

bei werden wie vorstehend oft Puppen gebildet, aus denen aber keine Fliegen schlüpfen. Offenbar sind die in den Puppen befindlichen Tiere so geschwächt, daß sie nicht die Hülle sprengen können. Nic.gly. gluc. übt in Konzentrationen von 0,5 und 0,25 g je 50 g Futter (1 % und 0,5 %) ebenfalls eine negative Wirkung auf die Vermehrung aus. Das gleiche gilt auch für die fluorhaltige Verbindung Nic.gly.pF-rib. (Tabelle 12 a).

Die Prüfungen wurden nach der Methode I teilweise über drei Fliegengenerationen durchgeführt.

Nach der Methode II wurden Nic.gly.rib., Nic.ala.rib., Nic.gly.rib., Nic.tyr.rib., Di-Ni-lys.rib., Nic.gly.gluc. und Nic.gly.pF-rib. in Konzentrationen von 0,5 bis 0,05 g je 45 g Futter und 6 ml äthanolischer Lösung (ca. 1 bis 0,1 %) über eine Generation geprüft.

Die Ergebnisse zeigen, daß Nic.gly.rib., Nic.ala.rib., Nic.glu.rib., Di-Nic.lys.rib., Nic.gly.gluc. und Nic.tyr. rib. in Konzentrationen von 0,5 bzw. 1 % (0,5 g bzw. 0,25 g je 50 g Futtermenge und Lösung) eine negative Wirkung auf die Vermehrung ausüben. Wie nach der vorigen Methode bilden sich bei einigen Futteransätzen nur Puppen aus, aus denen keine Fliegen schlüpfen. In der Konzentration von 0,2 % übt nur Nic.gly.gluc. eine negative Wirkung aus (Tabelle 12 b).

Tabelle 12 a: Übersicht über die Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung der Substanzen auf die Vermehrung von Fliegen nach Methode I (Anzahl der geschlüpften Fliegen)

1. Nicotinylglycinäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	300	259	256
2	-	322	193	130
3	-	71	60	20
	-	693	512	406

2. Nicotinylalaninäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	196	232	132
2	-	198	198	94
3	-	153	135	100
	-	547	565	326

3. Nicotinylmethioninäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	39	155	100	109
2	-	28	36	80
3	24	100	87	51
	63	283	223	240

Tabelle 12 a:

4. Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	326	313	285	281
2	198	193	156	178
3	-	-	-	-
	524	506	441	459

5. Nicotinylglutaminsäurediäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	105	233	173	158
2	137	272	163	124
3	136	127	171	75
	428	632	510	357

6. Nicotinyltryptophanäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	34	63	77	63
2	65	36	23	64
3	321	39	212	190
	420	138	317	317

Tabelle 12 a:

7. Nicotinyltyrosinäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	131	41	111	128
2	312	108	271	246
3	282	428	298	345
	725	577	680	719

8. Di-[Nicotinyl]-lysinäthylester

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	178	83	97	49
2	163	231	262	167
3	244	227	256	171
	585	546	615	387

9. Nic.gly.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	36	107	141
2	-	32	117	94
3	-	146	44	111
	-	214	268	346

Tabelle 12 a:

10. Nic.ala.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	123	198	178
2	145	180	148	127
3	-	115	102	116
	145	418	448	421

11. Nic.met.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	176	140	213
2	-	280	327	289
3	10	162	120	102
	10	618	587	604

12. Nic.S-bzl.-cys.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	116	205	158	122
2	198	290	198	182
3	68	128	171	172
	382	623	527	476

Tabelle 12 a:

13. Nic.glu.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	95	304	183	260
2	185	349	274	274
3	6	56	65	68
	286	709	522	602

14. Nic.tryp.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	28	61	223	232
2	81	114	101	113
3	-	-	-	-
	109	175	324	345

15. Nic.tyr.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	124	143	279	233
2	31	148	150	155
3	183	141	200	243
	338	432	631	631

Tabelle 12 a:

16. Di-Nic.lys.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	9	20	100	74
2	-	4	22	56
3	-	32	42	69
4	32	76	28	30
	41	132	192	229

17. Nic.gly.gluc.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	-	89	164
2	-	-	71	161
3	-	2	8	63
	-	2	168	388

18. Deb.Nic.gly.rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	117	108	87

19. Nic.gly.pF-rib.

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
Generation				
1	-	-	129	133
2	-	-	149	363
3	-	32	148	192
	-	32	426	748

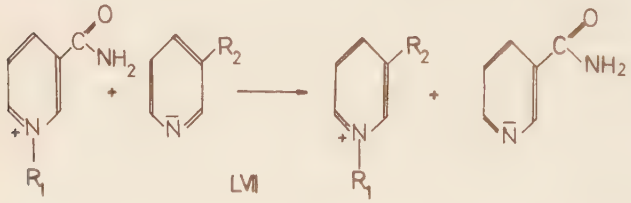
Tabelle 12 b: nach Methode II

Substanzzusatz	1 %	0,5 %	0,2 %	0,1 %
1. Nic.gly.rib.	-	80	264	285
2. Nic.ala.rib.	-	30	365	346
3. Nic.glu.rib.	-	194	350	461
4. Nic.tyr.rib.	25	91	409	540
5. Dic.Nic.lys. rib.	-	-	237	253
6. Nic.gly.gluc.	-	-	9	191
7. Nic.gly.pF- rib.	-	-	214	328
8. Nic.S-bzl. cys.rib.	94	400	427	445

7. Versuche zur Darstellung eines NAD-Analogen auf dem enzymatischen Weg.

7.1 Einführung in den enzymatischen Teil

Neben der Möglichkeit Komponenten von NAD-Analogen, Nicotinylaminosäureester und Nucleosid-Derivate, auf chemisch-synthetischem Wege darzustellen, wird, wie schon in der Einleitung zur Arbeit erwähnt, auf einen zweiten Weg hingewiesen, auf dem sich NAD-Analoge enzymatisch herstellen lassen. Dabei geht es hauptsächlich um den Austausch (Transferenz) zweier Nicotinsäurereste durch das Enzym NAD-Glykohydrolase (LVII).



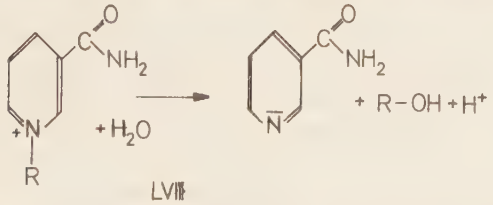
Als Versuchsbeispiel wurde die enzymatische Darstellung des Nicotinylglycinäthylester-Adenin-Dinucleotid (NGÄEAD) angesetzt, einer Verbindung, in der die 3-Carboxylgruppe des Pyridinringes durch Glycinäthylester substituiert ist. Für die enzymatischen Darstellungsversuche dieser Verbindung wurde das Enzym NAD-Glykohydrolase (E.C.3.2.2.5.), auch NAD-Nucleosidase, Pyridin-Transglykosidase und NADase genannt, verwendet.

Die Entdeckung und Gewinnung von NAD-Glykohydrolase wurde von Euler, Heiwinkel und Schlenk (21.78.) eingeleitet. Diese wiesen als erste Enzyme nach, die NAD inaktivieren. Mann und Quastel (56.) fanden dieselben im tierischen Gewebe und entdeckten, daß diese durch Nicotinamid gehemmt werden. Handler und Klein (31.) wiesen die Hydrolisierung der Nicotinamid-Ribose-Bindung des NAD durch diese Enzyme nach und Zatman und Mitarbeiter (105.) ihr Vorkommen im Schweinehirn und anderen Säugetiergeweben. Dabei entdeckten sie vor allem ihre transglykosierenden Eigenschaften.

Diese NAD-Glykohydrolasen katalysieren zwei Reaktionen:

1.) Den Austausch zweier Nicotinsäurereste, die Transferenz (LVII).

2.) Die Hydrolyse der Nicotinamid-Ribose-Bindung (LVIII).



LVIII

Da verschiedene Eigenschaften der Enzyme in verschiedenen Organen des gleichen Tieres und in gleichen Organen verschiedener Tiere festgestellt wurden (34.90.105.), nimmt man an, daß es keine einheitliche NAD-Glykohydrolase des Tierreiches gibt. Gefunden wird das Enzym in der mikrosomalen Fraktion des Zellhomogenisats, das sphärische Gebilde, bestehend aus Ribosomen, Lysosomen und Membranbruchstücken, enthält.

Die hydrolytische Aktivität der NAD-Glykohydrolase gegen NAD kann in der entgegengesetzten Richtung durch Nicotinamid, aber nicht durch Nicotinsäure gehemmt werden. Freies Nicotinamid konkurriert auch mit Wasser um die Bildung des aktiven Substrat-Enzym-Komplexes (105.107.), und eine hohe Nicotinamid-Konzentration fördert die Transferenzreaktion zwischen dem freien Nicotinamid und dem an NAD gebundenen. Durch die katalytische Wirkung des Enzyms können also NAD-Analoge durch Austausch mit dem am NAD gebundenen Nicotinamid gebildet werden. Auch besteht durch Unspezifizität des Enzyms in Bezug auf den auszutauschenden Pyridinrest die Möglichkeit, anstatt das Nicotinamid durch Pyridin-Analoge auch gegen ander Substanzen - wie Imidazol-Carboxamide, Histamine und Thiadiazole u.a. auszutauschen.

In diesem Fall ist auf die Liste bekannter NAD-Analoge zu verweisen (Tabelle 2). Im vorliegenden Teil dieser Arbeit wird die Gewinnung und Reinigung der NAD-Glykohydrolase aus tierischem Gewebe und die Benutzung der transgly-

kosidierenden Eigenschaft der gewonnenen Enzympräparate für den enzymatischen Syntheseversuch von NAD-Analogen beschrieben.

Das Enzym wird aus Schweinehirn unter Anwendung einer Methode nach Windmueller und Kaplan (94.) gewonnen, die Aktivitäten der Enzympräparate nach der Methode von Zatman und Kaplan (105.) und nach der von Sthatakos und Wallenfels (84.) modifizierten ermittelt, und der Proteingehalt mittels der Folin-Phenol-Reagenz nach der von Lowry (54.) modifizierten Methode bestimmt. Zur enzymatischen Synthese wird das Enzym nicht rein verwendet, da sehr angereicherte Enzympräparate bereits nach relativ kurzer Zeit erheblich an Aktivität verlieren (63.). Die transglykosidierende Eigenschaft des Enzyms wird zur Herstellung des Nicotinyglycinäthylester-Adenin-Dinucleosids verwendet.

7.2. Präparative Gewinnung des Enzyms NAD-Glykohydrolase (mit Herrn R. Hoffmann)

Methodik:

Die Schweinegehirne werden 24 Stdn. bei Zimmertemperatur der Selbstverdauung überlassen. Danach werden die Gehirne in einem Mixer mit dem 10-fachen Volumen kalten Acetons (-15°C) suspendiert. Nach dem Filtrieren wird das entstandene Pulver im Mixer mit dem 2-fachen Volumen kalten Butanols-(1) wieder suspendiert und anschließend filtriert. Dieser Arbeitsgang wird 2 mal mit dem 2-fachen Volumen Aceton und einmal mit dem 2-fachen Volumen Äther wiederholt. Das erhaltene Pulver wird nun 20 Stdn. im Kühlraum auf einer Unterlage dünn verteilt und zwecks Entfernung der organischen Lösungsmittel stehen gelassen.

Es werden nun je 40 g des Pulvers im Mixer bei Zimmertemperatur in 1 l 0,01 m Phosphatpuffer (pH 7,5) suspendiert und in der Ultrazentrifuge mit einer Umdrehungszahl, die 13000 x g entspricht, 20 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wird dann abgegossen und der Arbeitsgang wiederholt. Das zurückbleibende Sediment wird dann in 1 l 0,1 m Phosphatpufferlösung (pH 7,5) suspendiert und im Wasser-

bad auf 37°C erwärmt. Nun werden 200 mg Trypsin in 10 ml Pufferlösung und zu der obigen Lösung hinzugegeben. Nach 45 Min. Inkubationszeit werden 250 mg Trypsin-Inhibitor, gelöst in 10 ml Pufferlösung, zugegeben und das Ganze auf dem Eisbad abgekühlt. Das Enzym wird durch die ersten Zentrifugationen von den löslichen Proteinen getrennt und ist dann nach der Trypsinbehandlung in einer Form, die nur bei einer Umdrehungszahl, die 100.000 x g entspricht, sedimentiert.

Die Suspension wird nach der Trypsin-Behandlung 30 Min. lang bei 13.000 x g und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wird daraufhin mit HCl auf pH 3,1 eingestellt, mit NaOH wird er anschließend auf pH 7,5 gebracht und mit Trichloressigsäure auf pH 3,1. Bei diesem pH-Wert befindet sich das Enzym in einer unlöslichen Form und wird bei 13.000 x g und 0°C in 30 Min. abzentrifugiert. Es wird dann in 0,05 m Phosphatpufferlösung (pH 7,5) bei -18°C aufbewahrt.

Nachdem das gesamte Pulver dieser Prozedur unterzogen worden war, werden die Endsuspensionen zusammengegeben und wie folgt behandelt:

Die Suspensionen werden 12 Stdn. gegen 0,005 m Phosphatpufferlösung (pH 7,5) im Kühlraum bei ca. 5°C dialysiert. Nach einer Proteinbestimmung werden 3,5 mg DEAE-Cellulose pro mg Protein zugegeben und die Suspension 20 Min. lang gerührt. Der Rückstand wird dann bei 4000 Upm abzentrifugiert und der Überstand auf eine Säule, gepackt mit CM-Cellulose, gegeben. Nun wird so viel Pufferlösung durch die Säule geschickt, bis keine Proteine mehr nachgewiesen werden. Anschließend wird die Säule mit einem Konzentrationsgradienten von 0,005 bis 0,03 m Phosphatpufferlösung behandelt, von dem Eluat 10-ml-Proben gesammelt und die Aktivität bestimmt.

7.2.1. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die oben beschriebene Methode wurde zunächst zur Herstellung einer kleineren Menge Ausgangsmaterials angewandt. Es wurden 170,5 g frisches Schweinegehirn verarbeitet und daraus 26,89 g Acetonpulver erhalten. Die gesamte Menge Acetonpulver wurde nach der oberen Vorschrift verarbeitet. Die Lösungsmittelmengen wurden für 27 g berechnet. Die Gradientenlösung für die CM-Cellulosesäule betrug 100 ml: 50 ml 0,005 m Phosphatlösung, pH 7,5, und 50 ml 0,03 m Phosphatlösung, pH 7,5.

Proben für die Aktivitätsbestimmungen:

Probe 1: Probe nach der Trypsinbehandlung
Probe 2: Probe nach der Fällung mit CCl_3COOH
Probe 3: Probe nach der DEAE - Cellulose-Behandlung
Probe 4: Probe, aus der CM-Cellulosesäule erhaltene beste Fraktion

Tabelle 13:

Probe	Spezif.Aktivität U/mg Protein	% (bezogen auf Gesamt-U der Tabelle 14)
Acetonpulver	0,014	100
1	0,035	66
2	0,061	25
3	0,150	20
4	14	10

Tabelle 14: Bestimmung der Aktivitäten

Ansatz: 200 bzw. 5 µl Enzympräparat, 0,3 ml Phosphatpuffer (pH 7,5), bidest. Wasser auf 0,5 ml und 0,1 ml 0,005 m NAD-Lösung werden 8 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 3 ml 1,0 m KCN-Lösung versetzt. Die Extinktion wird bei 325 nm abgelesen.

Tabelle 14: Bestimmung der Aktivitäten

Probe	Vol. d. Probe (µl)	Gesamtmenge	Extinktion	NAD (µMol)	umges. NAD (µMol)	U	Gesamt-U
Acetonpulver	200 (1mg/ml)	26,89 g	0,65	0,491	0,009	0,001	147,9
1	200	690 ml	0,38	0,276	0,224	0,028	97,5
2	200	160 ml	0,15	0,110	0,390	0,048	38,4
3	200	155 ml	0,21	0,190	0,310	0,038	29,5
4	5	2 ml	0,29	0,220	0,280	0,035	14,0

Tabelle 15: Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Probe	Vol. d. Probe (µl)	Extinktion	Protein in der Probe (mg)	Gesamtprotein gehalt (mg)
Aceton-pulver	10	0,012	0,004	10720
1	50	0,50	0,200	2785
2	50	0,49	0,195	624
3	50	0,10	0,040	196
4	50	0,065	0,025	1

Lösungen zur Proteinbestimmung:

Folin-Reagenz: 100 g $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, 25 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 700 ml Wasser, 50 ml 85%ige H_3PO_4 und 100 ml konz. HCl werden am Rückflußkühler 10 Stdn. langsam gekocht. Dann werden 150 g $LiSO_4$, 50 ml Wasser und einige Tropfen Brom hinzugesetzt und das Gemisch ohne Kühler erhitzt. Nach dem Filtrieren wird die Lösung mit ausgekochtem Wasser so verdünnt, daß sie einer 1 n - Säurelösung entspricht.

Kupfersalzlösung I: 50 ml 2%ige Na_2CO_3-Lösung in 0,1 n NaOH und 1 ml einer 0,5%igen $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-Lösung in 1%iger Na-Tartrat-Lösung

Probe 1: Probe nach der Trypsinbehandlung
Probe 2: Probe nach der Fällung mit CCl_3COOH
Probe 3: Probe nach der DEAE-Cellulose-Behandlung
Probe 4: aus der CM-Cellulosesäule erhaltene beste Fraktion

Tabelle 15: Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Ansatz: 50 µl Enzympräparat, bidest. Wasser auf 2 ml; 5,0 ml Kupfersalzlösung I werden nach 10 Min. mit 0,5 ml Folinreagenz versetzt. Nach weiteren 30 Min. wird bei 720 nm abgelesen.

Proben 1 bis 4 wie in der vorigen Tabelle.

7.2.2. Herstellung einer größeren Menge des Enzyms (nach obiger Vorschrift, 94.)

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden 2000 g frisches Schweinegehirn zu 338,7 g Acetonpulver verarbeitet. Davon wurden 5 Portionen zu je 40 g dieses Pulvers aufgearbeitet und nach der Fällung mit Trichloressigsäure und anschließender Zentrifugierung in 0,05 m Phosphatpufferlösung (pH 7,5) als Suspension eingefroren. Diese 5 Suspensionen wurden zusammen gegen 0,05 m Phosphatpufferlösung dialysiert und dann mit DEAE-Cellulose behandelt. Es wurden 700 ml Enzymlösung erhalten.

Gesamtproteinbestimmung (E = Extinktion, V = Volumen, umges. = umgesetztes):

V d. Probe	E.	mg in d. Probe	Gesamtproteingehalt
10 µl	0,11	0,043	3010 mg

Aktivitätsbestimmung:

V d. Probe	E.	µ Mol NAD	umges. µ Mol NAD	U	Gesamt-U
50 µl	0,35	0,255	0,245	0,03	504

Die Werte ergaben eine spezifische Aktivität von 0,166 U/mg Protein. Die Lösung enthielt 0,72 U/ml.

Von den 700 ml Enzymlösung wurden 580 ml auf zwei CM-Cellulosesäulen von 21 cm Höhe und 1,5 cm Durchmesser mit 4,8 g trockener Cellulose (oder 16 g vorgequollener) gepackt gegeben. Nach dem Auftragen der Enzymlösung wurde der 0,005 m Phosphatpuffer (pH 7,5) durch die Säule geleitet, bis dieser proteinfrei aus der Säule herauskam.

Dazu wurden 250 ml Phosphatpuffer je Säule benötigt. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 17 ml/Std. Anschließend wurde ein Konzentrationsgradient im Bereich von 0,005 bis 0,03 m Phosphatpufferlösung (pH 7,5) mit einem Gesamtvolumen von 200 ml pro Säule aufgetragen und Fraktionen von je 6 ml aufgefangen. Das Enzym erschien im Konzentrationsbereich von 0,008 bis 0,03 m Phosphatpuffer, die besten Fraktionen zwischen 0,015 und 0,02 m.

Tabelle 16: Aktivitätsbestimmungen der Enzymfraktionen

Ansatz: 0,1 ml Enzympräparat, 0,3 ml Phosphatpufferlösung (pH 7,5), und 0,1 ml NAD-Lösung werden nach 8 Min. Inkubationszeit mit 3,0 ml 1 m KCN-Lösung versetzt und die Extinktion bei 325 nm abgelesen. Die zugesetzte NAD-Menge beträgt 0,516 μMol/0,1 ml NAD-Lösung.

Tabelle 17: Proteinbestimmung der Fraktionen

Ansatz: 50 - 500 μl Enzympräparat werden mit bidest. Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt und mit 5,0 ml Kupfersalzlösung I versetzt. Nach 10 Min. Reaktionszeit kommen 0,5 ml Folinreagenz hinzu und nach weiteren 30 Min. wird die Extinktion bei 720 nm abgelesen.

7.3. Versuch der enzymatischen Darstellung des NAD-Analogen Nicotinylglycinäthylester-Adenin-Dinucleotid (NGÄEAD)

Als zweiter Weg zur Darstellung eines NAD-Analogen wurde in diesem Teil versucht, das Nicotinylglycinäthylester-Adenin-Dinucleotid (NGÄEAD) auf enzymatischem Weg zu syn-

Tabelle 16: Aktivitätsbestimmung

Fraktion	Gesamt-Volmen ml	Vol.d. Probe (µl)	Extinktion	NAD (µMol)	umges. NAD (µMol)	U	Gesamt - U
20	12	100	0,30	0,220	0,296	0,037	4,44
21	12	100	0,30	0,220	0,296	0,037	4,44
22	12	100	0,34	0,248	0,268	0,033	4,02
23	12	10	0,71	0,510	0,006	0,0007	0,90
24	12	100	0,31	0,224	0,292	0,036	4,38
25	12	100	0,12	0,088	0,428	0,0535	6,42
26	12	100	0,025	0,018	0,498	0,0622	7,47
27	12	100	0,005	0,001	0,515	0,0644	7,72
28	12	100	0,07	0,004	0,512	0,0640	7,68
29	12	100	0,03	0,02	0,496	0,0620	7,44
30	12	100	0,05	0,03	0,486	0,0607	7,29
31	12	100	0,075	0,04	0,476	0,0595	7,14
32	12	100	0,12	0,088	0,428	0,0535	6,42
33	6,2	100	0,42	0,308	0,192	0,024	1,48
34	10	100	0,38	0,276	0,224	0,028	4,82

Tabelle 17: Proteinbestimmung

Fraktion	Volumen d. Probe µl	Extinktion	Protein in der Probe mg	Gesamtproteinmenge mg	Spezif.Aktivität Protein U/mg
20	100	0,015	0,006	0,72	6,166
21	50	0,025	0,010	2,40	1,850
22	50	0,015	0,006	1,44	2,790
23	50	0,005	0,002	0,48	1,900
24	500	0,020	0,008	0,19	23,05
25	500	0,022	0,008	0,21	30,57
26	500	0,060	0,024	0,57	13,10
27	500	0,040	0,016	0,30	25,70
28	100	0,016	0,006	0,77	10,00
29	100	0,010	0,004	0,48	15,50
30	50	0,005	0,002	0,48	15,10
31	100	0,014	0,006	0,67	10,62
32	50	0,010	0,004	0,96	6,60
33	500	0,035	0,014	0,173	8,57
34	500	0,070	0,029	0,58	4,82

thetisieren. Dabei galt es besonders zu prüfen, ob dieser Weg gangbar ist, und ob diese NAD-Analoge, die nach der Literatur schwierig herzustellen sind, auch nachweisbar sind.

Vorschrift:

Das Reaktionsgemisch, bestehend aus 6 U NAD-Glykohydrolase, 0,625 ml 1 m Phosphatpufferlösung (pH 7,5), 0,223 g Nicotinylglycinäthylester, 0,2 g NAD und bidest. Wasser in einem Gesamtvolumen von 15 ml, wurde 3 bis 3 1/2 Stdn. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Zugabe von 0,75 g Trichloressigsäure denaturisiert und durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend mit dem 5-fachen Volumen kalten Acetons (-18°C) versetzt und der Niederschlag abfiltriert, der dann in bidest. Wasser aufgenommen und gelöst wurde. Durch Gefriertrocknung wurde das Wasser entfernt. Der Reaktionsverlauf wurde durch eine 15 bis 30 minutige Probeentnahme verfolgt. 30 µl-Proben wurden mit einer Lösung mit einem Gehalt an 0,1 m Glycin/NaOH-Puffer (pH 9,5), 0,5 m Äthanol und 0,02 m Nicotinamid gemischt. Die Reaktion wurde eingeleitet durch Zugabe von 0,2 ml Alkoholdehydrogenase-Enzymlösung in 0,01 m Phosphatpuffer (pH 7,5) und 0,1%iger BSA-Lösung (15 U/ml). Die Extinktion wurde bei 340 nm bestimmt.

Es bildet sich zuerst durch Einwirkung der Alkoholdehydrogenase aus dem NAD das NADH, das durch die Extinktion bei 340 nm bewiesen wird. Anschließend tritt eine starke Abnahme der Extinktion bei 340 nm ein, woraus auf eine Reaktion des NADH geschlossen werden muß (Abb. 33 + 34)

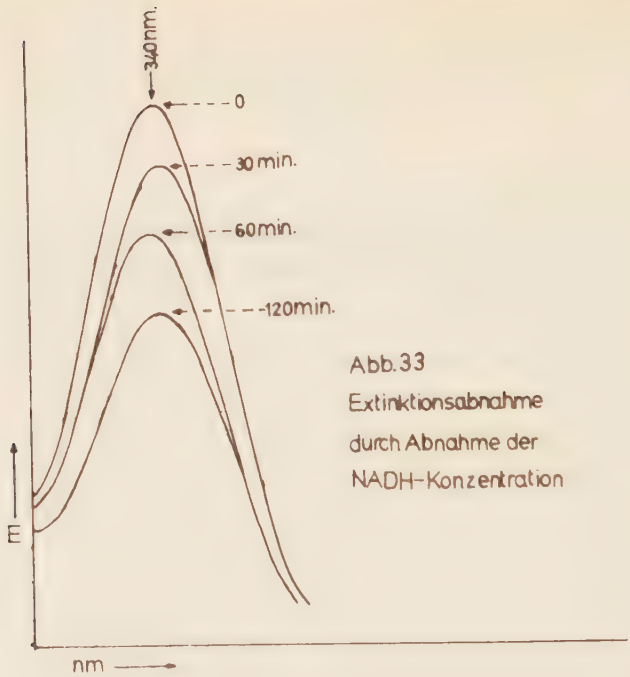


Abb. 33
Extinktionsabnahme durch Abnahme der NADH-Konzentration

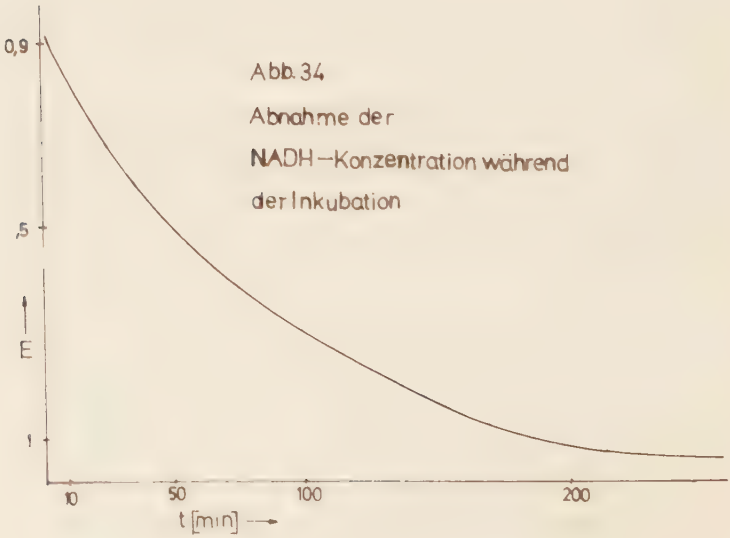


Abb. 34
Abnahme der NADH-Konzentration während der Inkubation

Tabelle 12

Zeit	Extinktion	Zeit	Extinktion
1	0,85	120	0,20
15	0,78	150	0,14
30	0,56	180	0,085
45	0,52	210	0,055
60	0,44	240	0,055
90	0,32		

Nachweis der NGÄZAD-Bildung

Da NAD mit CN^--Ionen einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 325 nm bildet (91), lag es nahe, daß das NGÄZAD wegen des quaternären N-Atoms am Pyridinring gleichfalls einen Cyanid-Komplex bildet, das durch ein Absorptionsmaximum gekennzeichnet ist. Durch Untersuchung des Absorptionsspektrums wurde ein verwendbares Absorptionsmaximum bei 392 nm gefunden. Das zeigt bei der folgenden Austauschreaktion, die nach der gleichen Vorschrift aber unter Zusatz von 1,0 m KCN-Lösung durchgeführt wurde, eine Zunahme der Extinktion innerhalb von 90 Min. und damit eine Zunahme des NGÄZAD-Cyanid-Komplexes (Abb. 35)

Auf die Ausfällung und Reinigung des ausgefallenen Produkts und Identifizierung durch Spektralanalyse wurde aus Zeitmangel verzichtet. Die Entstehung eines neuen Extinktionsmaximums dürfte als Beweis für die Bildung eines NGÄZAD-CN-Komplexes genügen.

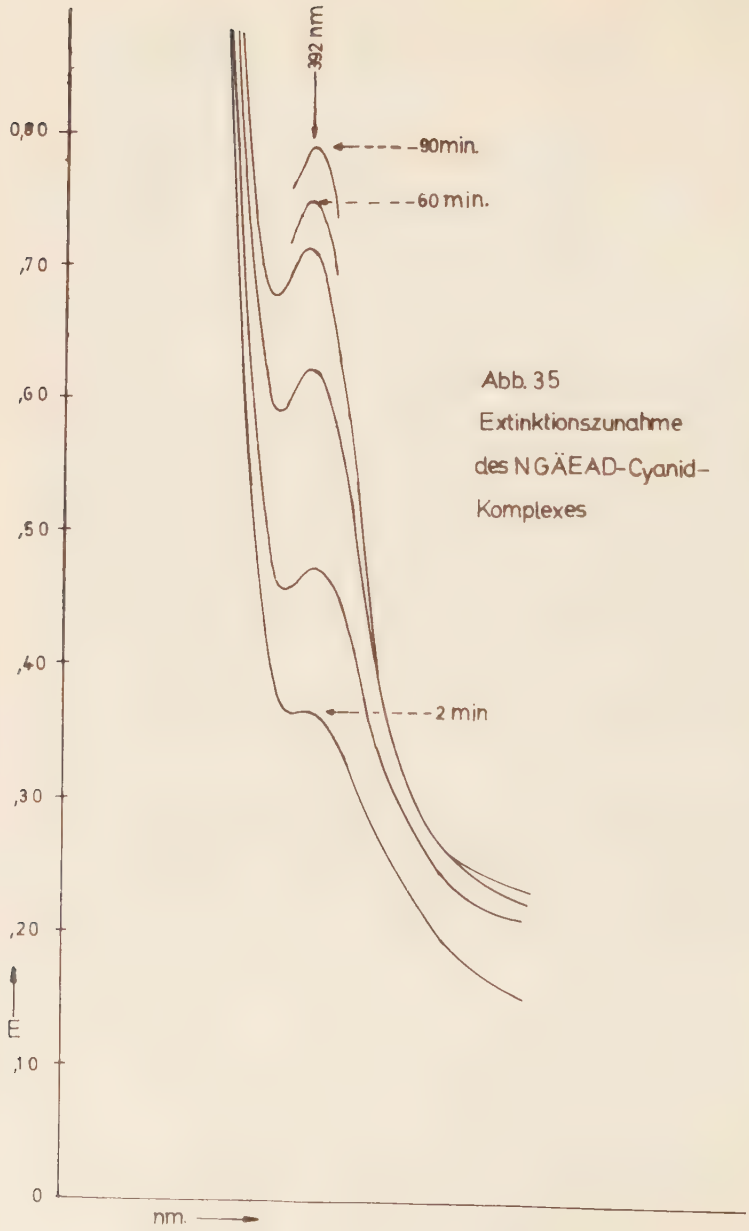


Abb. 35
Extinktionszunahme
des NGÄEAD-Cyanid-
Komplexes

8. Spezieller experimenteller Teil

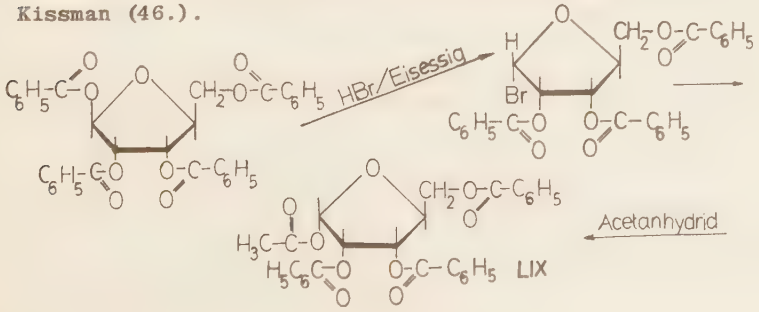
Wiedergabe der Vorschriften:

1.) der Ausgangsverbindungen
2.) der Nicotinylaminosäureester
3.) der Vor- und Hauptversuchsansätze der benzoylierten Nucleoside (gültige Vorschriften); eine zusammenfassende Besprechung der Versuchsbedingungen mit Tabellen und Vorschriften für Syntheseversuche weiterer Stufen

8.1. Vorschriften zur Darstellung der Ausgangsverbindungen

8.1.1. 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LIX)

Das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) enthält im Nicotinamid- und Adeninteil des Moleküls als Zuckerkomponente die D-(-)-Ribose. Um diesen Zucker bei der Synthese der benzoylierten Nucleosid-Derivate, Komponenten von NAD-Analogen, mit dem Nicotinamid bzw. dem substituierten Pyridin zu kuppeln, müssen die freien Hydroxylgruppen an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 5 der Ribose mit einer Schutzgruppe, in diesem Fall mit der Benzoylgruppe, geschützt werden. Am C-1-Atom der Ribose wird nach der Benzoylierung mit Benzoylchlorid, anschließender Bromierung und Abspaltung des Broms mittels Acetanhydrid, eine Acetoxygruppe eingeführt, die dann bei weiterer Verarbeitung durch HCl in ätherischer Lösung abgespalten und durch das Chloratom ersetzt wird. Wir erhalten dann 2.3.5-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosylchlorid bzw. 1-Chlor-2.3.5.-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose, die mit dem substituierten Pyridin in C-1-Stellung kuppelt. Die Vorschrift folgt analog der von H.M. Kissman (46.).



Vorschrift:

15,0 g (0,1 Mol) D-(-)-Ribose, im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, werden in 230 ml absolutem Methanol unter Rühren gelöst. Die Lösung wird nun mit 100 ml absolutem Methanol, das 1,5 g HCl gelöst enthält, versetzt und 90 Min. bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wird diese Lösung mit 30 ml Pyridin versetzt und im Vakuum bei 40 - 45°C bis zu einem Sirup eingeengt, der nochmal mit 30 ml absolutem Pyridin versetzt wird. Das wird gleichfalls abdestilliert. Der sirupöse Rückstand wird in 80 ml Dichlormethan und 175 ml absolutem Pyridin gelöst und im Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Unter Schütteln und Abkühlen werden nun portionsweise 59 ml (71,2 g) Benzoylchlorid zu der abgekühlten Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt dann 3 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann in 400 ml Wasser eingegossen und gut durchgeschüttelt. Die Phasen werden im Scheidetrichter abgetrennt und die wäßrige Phase 3 mal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wird nun mit der abgetrennten Pyridin-Dichlormethan-Phase vereinigt und zusammen 2 mal mit je 40 ml Wasser, 3 mal mit je 40 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und nochmal 2 mal mit je 40 ml Wasser gewaschen. Die Waschwässer werden nochmal mit 20 ml Chloroform nachgewaschen. Die gereinigte Lösung wird nun mit Na_2SO_4 getrocknet, danach filtriert und im Vakuum eingedampft. Das Restpyridin im sirupösen Rückstand wird durch Kodestillation mit Toluol beseitigt, der dann mit 34 ml Eisessig und 166 ml HBr/Eisessig (36,5%ig) versetzt und 30 Min. bei Zimmertemperatur gerührt wird. Dann wird die Lösung mit 140 ml Eisessig verdünnt, auf dem Eis-NaCl-Bad gekühlt und unter Kühlung bei 7 - 11°C tropfenweise mit 100 ml Wasser versetzt. Es wird danach ohne Kühlung noch 25 Min. weitergerührt. Die Lösung wird dann in 1,6 l Wasser geschüttet und die heterogene Mischung gut durchgeschüttelt. Beide Phasen werden getrennt; die wäßrige mit 600 ml Chloroform in 4 Portionen ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung, die mit der abgetrennten HBr/Eisessig-Phase vereinigt wird, wird 2 mal mit je 80 ml Wasser, 5 mal mit je 80 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und 2 mal mit je 80 ml Wasser durch Schütteln gereinigt.

Die Waschwässer werden anschließend mit ca. 80 ml Chloroform nachgewaschen. Die vereinigten Chloroformlösungen werden danach mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bei 40°C bis zum Sirup eingeengt. Der Rückstand wird nun in 120 ml Chloroform und 120 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 28 ml Acetanhydrid versetzt. Die Reaktions-Lösung bleibt 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Danach wird diese im Vakuum bei 40°C auf 60 - 100 ml eingeengt und in 200 ml Wasser und 80 ml Chloroform eingegossen. Nach dem Schütteln und Abtrennen der Phasen wird die wäßrige 5 mal mit je 20 ml Chloroform extrahiert, die gesamte, vereinigte Chloroformlösung anschließend 2 mal mit je 20 ml Wasser, 2 mal mit je 100 ml $NaHCO_3$ und 2 mal mit je 25 ml Wasser portionsweise nacheinander gewaschen und die Waschwässer nochmal 2 mal mit je 30 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird dann mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 40°C eingedampft, das restliche Pyridin durch Kodestillation 4 mal mit je 30 - 40 ml Toluol beseitigt. Das auskristallisierte Produkt wird nach dem Absaugen aus Äthanol/Essigsäureäthylester (5:2) umkristallisiert.

Ausbeute :	31,7 g 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (62,8 % d. Th.)		
Schmelzpunkt:	126 - 128°C	Lit.: 126 - 129°C	
Bruttoformel:	$C_{28}H_{24}O_9$	C (gefunden)	66,20 %
		(berechnet)	66,66 %
		H (gefunden)	4,70 %
		(berechnet)	4,79 %
Molgewicht :	504,50		

8.1.2. 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose (LX)

18,0 g (0,1 Mol) D-(+)-Glucose werden in 600 ml absolutem Methanol, in denen 9 g HCl gelöst sind, gelöst. Danach wird 90 Min. bei Zimmertemperatur gerührt und 60 ml Pyridin hinzugefügt. Die Reaktionslösung wird dann bei 45°C im Vakuum bis zu einem dünnflüssigen Sirup eingeengt, dem weitere

30 ml Pyridin zugegeben werden. Es wird dann bis zu einem dicken Sirup im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit 180 ml absolutem Pyridin und 80 ml absolutem Dichlormethan versetzt. Danach wird die Lösung im Eis-NaCl-Bad gekühlt und mit 67,5 ml (81,4 g) Benzoylchlorid portionsweise unter Schütteln und Kühlen versetzt. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann in 400 ml Wasser eingegossen. Die Phasen werden nach dem Schütteln getrennt und die wäßrige 3 mal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform- und die Pyridin-Dichlormethan-Lösung werden nun vereinigt und 3 mal mit je 70 ml $NaHCO_3$-Lösung und 2 mal mit je 70 ml Wasser nacheinander gewaschen. Die Lösung wird danach mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bei 40°C eingedampft. Die Pyridinreste werden durch dreimalige Kodestillation mit je 30 - 40 ml Toluol entfernt und der Rückstand unter Eis-NaCl-Kühlung mit 175 ml HBr Eisessig (36,7 %ig) versetzt. Die Reaktionsmischung wird nun 30 Min. bei Zimmertemperatur gerührt, dann mit 140 ml Eisessig versetzt und auf dem Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Bei einer Temperatur unter 11°C werden daraufhin 100 ml Wasser langsam hinzugetropft, danach 20 Min. bei Zimmertemperatur gerührt, wobei keine Phasenbildung auftritt. Die Lösung wird nun in 1,5 l Wasser eingegossen, die HBr Eisessig-Phase abgetrennt und die wäßrige Phase 4 mal mit je 150 ml Chloroform ausgeschüttelt, das mit der ersten Phase vereinigt wird. Darauf wird die Lösung 5 mal mit je 80 ml $NaHCO_3$-Lösung und 3 mal mit je 80 ml Wasser gewaschen. Die Waschwässer werden zusammen 2 mal mit je 30 ml Chloroform nachgewaschen. Die Chloroformlösung wird nun mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bis auf ca. 120 ml Lösungsvolumen eingedampft, zu dem noch 120 ml Pyridin und 30 ml Acetanhydrid kommen. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen und wird dann im Vakuum bei 40°C auf ca. 100 ml Lösung eingedampft. Zu dieser werden nun 100 ml Wasser und 100 ml Chloroform gegeben, die erhaltene Lösung geschüttelt und die wäßrige Phase abgetrennt, die dann 3 mal mit je 70 ml Chloroform extrahiert wird. Anschließend werden die Chloroformlösung und die abgetrennte Phase zusammen 2 mal mit je 30 ml gesättigter

$NaHCO_3$-Lösung und 2 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Die Waschwässer werden mit 20 ml Chloroform nachgewaschen, die Extrakte mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 40°C eingeengt. Das restliche Pyridin wird durch Kodestillation 4 mal mit je 30 - 40 ml Toluol beseitigt. Der Rückstand ist von dunkelbrauner Färbung. Er wird nochmal in ca. 250 ml Chloroform gelöst, mehrmals mit Wasser gewaschen, mit Aktivkohle behandelt und nach Trocknen mit Na_2SO_4 im Vakuum zu einem dicken Sirup eingedampft, der dann im Kühlschrank nur zu einem geringen Teil kristallisierte.

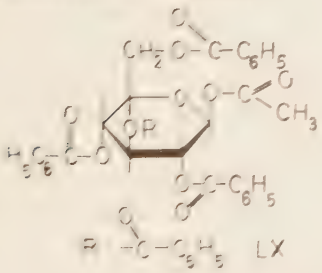
Ausbeute : 45,8 g 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose · $1H_2O$

Schmelzpunkt: sirupartiges Produkt

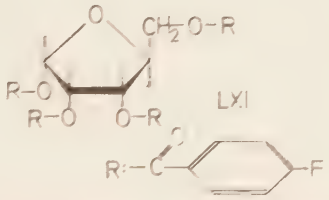
Bruttoformel: $C_{36}H_{30}O_{11} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	66,20 %
	(berechnet)	65,84 %
H	(gefunden)	5,00 %
	(berechnet)	4,90 %

Molgewicht : 656,65



LX



LXI

8.1.3. 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose (LXI)

4,5 g (0,03 Mol) D-(-)-Ribose, im Vakuum über P_2O_5 getrocknet, werden in 70 ml absolutem Methanol unter Rühren gelöst. Die Lösung wird nun mit 30 ml absolutem Methanol, das 0,5 % HCl gelöst enthält, versetzt und 90 Min. bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wird diese Lösung mit 10 ml Pyridin versetzt und im Vakuum bei 40 - 45°C bis zu einem Sirup eingeengt, der nochmal mit 30 ml Pyridin versetzt wird. Das wird

gleichfalls abdestilliert. Danach wird der sirupöse Rückstand in 25 ml Dichlormethan und 52 ml absolutem Pyridin gelöst und im Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Unter Schütteln und Abkühlen werden nun portionsweise 23,8 g p-Fluorbenzoylchlorid zu der abgekühlten Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt dann 3 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann in 120 ml Wasser eingegossen und gut durchgeschüttelt. Die Phasen werden im Scheidetrichter abgetrennt und die wäßrige Phase 3 mal mit je 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wird nun mit der abgetrennten Pyridin-Dichlormethan-Phase vereinigt und zusammen 2 mal mit je 15 ml Wasser, 3 mal mit je 15 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und nochmal 2 mal mit je 15 ml Wasser gewaschen. Die Waschwässer werden nochmal mit 10 ml Chloroform nachgewaschen.

Die gereinigte Lösung wird nun mit Na_2SO_4 getrocknet, dann filtriert und im Vakuum eingedampft. Das Restpyridin im sirupösen Rückstand wird durch Kodestillation mit Toluol beseitigt, der dann mit 10 ml Eisessig und anschließend unter Kühlung mit 50 ml HBr/Eisessig (36,5 %ig) versetzt und 30 Min. bei Zimmertemperatur gerührt wird. Dann wird die Lösung mit 42 ml Eisessig verdünnt, auf dem Eis-NaCl-Bad gekühlt und unter Kühlung bei 5 - 10°C tropfenweise mit 30 ml Wasser versetzt. Es wird dann ohne Kühlung noch 25 Min. weitergerührt. Die Lösung wird dann in 480 ml Wasser eingegossen und die heterogene Mischung gut durchgeschüttelt. Beide Phasen werden getrennt; die wäßrige mit 240 ml Chloroform in 4 Portionen ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung, die mit der abgetrennten HBr/Eisessig-Phase vereinigt wird, wird 2 mal mit je 25 ml Wasser, 5 mal mit je 25 ml gesättigter $NaHCO_3$- Lösung und 2 mal mit je 25 ml Wasser durch Schütteln gereinigt. Die Waschwässer werden anschließend mit ca. 25 ml Chloroform nachgewaschen. Die vereinigten Chloroformlösungen werden anschließend mit Na_2SO_4 getrocknet und zusammen mit einem ausgefallenen Niederschlag filtriert. Das Filtrat wird dann bei 40°C bis zu einem Sirup eingeengt. Der Rückstand wird nun in 40 ml Chloroform und 40 ml absolutem Pyridin gelöst und

mit 8,5 ml Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen.

Danach wird die Reaktionslösung im Vakuum bei 40°C auf 60 - 100 ml eingedampft und in 60 ml Wasser und 25 ml Chloroform eingegossen. Nach dem Schütteln und Abtrennen der Phasen wird die wäßrige 5 mal mit je 10 ml Chloroform extrahiert, die gesamte, vereinigte Chloroformlösung anschließend 2 mal mit je 10 ml Wasser, 2 mal mit je 30 ml $NaHCO_3$-Lösung und 2 mal mit je 20 ml Wasser portionsweise nacheinander gewaschen und die Waschwässer nochmal 2 mal mit je 10 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird dann mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 40°C eingedampft, das restliche Pyridin durch Kodestillation 4 mal mit je 10 - 15 ml Toluol beseitigt. Das auskristallisierte Produkt wird nach dem Absaugen aus Äthanol/Essigsäureäthylester (5:2) umkristallisiert.

Ausbeute : 4,7 g 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose (28,05 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 144 - 146°C

Bruttoformel: $C_{28}H_{21}F_3O_9$

C	(gefunden)	60,13 %
	(berechnet)	60,22 %
H	(gefunden)	3,78 %
	(berechnet)	3,79 %
F	(gefunden)	9,61 %
	(berechnet)	10,22 %

Molgewicht : 558,476

8.1.4. Darstellung des S-Benzyl-L-cysteinäthylester-hydrochlorids

8.1.4.1. S-Benzyl-L-cystein

Für die Verwendung von Cystein als S - haltige Aminosäure bei der Kupplung mit Nicotinylchlorid-hydrochlorid zur Darstellung der Nicotinylaminosäureäthylester muß die bei der Reduktion des Cystins entstehende SH - Gruppe durch eine Schutzgruppe, in diesem Fall durch die Benzylgruppe, ge-

schützt werden. Es wird eine Vorschrift von Harington und Rivers (32.) verwendet.

Vorschrift:

Etwa 1,5 l flüssiges NH_3 werden in einem 2-l-Dreihalskolben gesammelt und mit Isoliermaterial in einem Topf isoliert. Unter Rühren werden nun kleine Na-Stückchen bis zur Blaufärbung des NH_3 zugegeben. Diese Färbung wird dann durch portionsweise Zugabe von L-Cystin beseitigt. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis 60 g L-Cystin in flüssigem NH_3 durch das Na reduziert und durch überschüssiges Na eine Blaufärbung zurückbleibt. Diese wird dann durch Zugabe von trockenem NH_4Cl beseitigt. Nun werden 60 ml frisch destilliertes Benzylchlorid unter Rühren zugetropft und danach das restliche flüssige NH_3 durch Entfernen der Isolierung verdampft. Dann wird der Rückstand in ca. 800 ml H_2O gelöst und die Verunreinigungen durch mehrmaliges Schütteln mit ca. 500 ml Äther beseitigt. Dann wird die wäßrige Schicht durch Durchsaugen von Luft vom restlichen Äther befreit und die Lösung mit Aktivkohle behandelt und filtriert. Das S-Benzyl-L-cystein wird dann durch Ansäuern mit HCl auf pH 5 - 6 ausgefällt und nach dem Stehen im Kühlschrank abgesaugt. Der Niederschlag wird dann aus ca. 8 l Wasser umkristallisiert und nach dem Absaugen im Trockenschrank bei 80°C getrocknet.

Ausbeute : 71,8 g S-Benzyl-L-cystein (68 % d. Th.)
Schmelzpunkt: 204°C

8.1.4.2. S-Benzyl-L-cysteinäthylester-hydrochlorid (LXII)

250 ml Äthanol werden mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigt. Darin werden 15 g S-Benzyl-L-cystein gelöst und bis zu 60°C die Lösung einige Zeit erwärmt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abgesaugt und der feste Rückstand in 250 ml heißem Äthanol gelöst. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 250 ml kaltem Äther versetzt und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Es fiel ein Niederschlag aus, der nach Versetzen der Lösung mit weiterem

Äther abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Ausbeute : 13,0 g S-Benzyl-L-cysteinäthylester-hydrochlorid (75,2 % d. Th.)

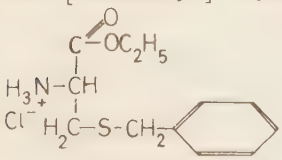
Schmelzpunkt: 118 - 119°C

8.2. Vorschriften zur Darstellung der Komponenten von NAD-Analogen

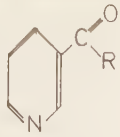
8.2.1. Vorschriften zur Darstellung der Nicotinylaminosäureester

Für die Synthese von Komponenten der NAD-Analoge wird das Nicotinamid an der Carboxamido-Gruppe substituiert. Dafür werden Aminosäureäthylester-hydrochloride verwendet, die nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Diese kuppeln mit der Aminogruppe an der vorher in ein Säurechlorid überführten Nicotinsäure, dem Nicotinsäurechlorid-hydrochlorid, wobei Triäthylamin bzw. Pyridin als halogenaufnehmende Substanz verwendet wird. Man erhielt am C-3-Atom des Pyridinringes eine Peptidgruppierung -CONH-, welche von Interesse ist.

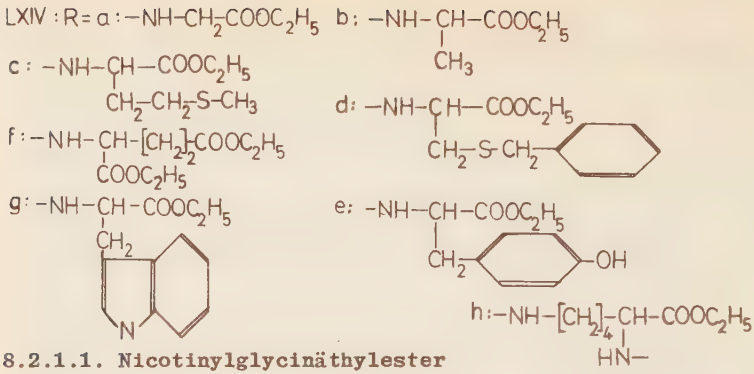
Zu Aminosäureäthylester-hydrochloriden werden aus der Reihe der einfachen Aminosäuren: Glycin und DL-α-Alanin, der S-haltigen: DL-Methionin und L-Cystein, der aromatischen: L(-)Tyrosin, der Aminodicarbonsäuren: L-(+)-Glutaminsäure, der heterocyclischen: DL-Tryptophan und der Diaminosäuren: DL-Lysin, verwendet, die mit Nicotinylchlorid-hydrochlorid in den entsprechenden Nicotinylglycin- (LXIVa), -alanin- (LXIVb), -methionin- (LXIVc), -S-benzyl-L-cystein- (LXIVd) und -tyrosinäthylester (LXIVe), Nicotinylglutaminsäurediäthylester (LXIVf) und -tryptophanäthylester (LXIVg) und Di-[nicotinyl]-lysinäthylester (LXIVh) überführt werden.



LXII

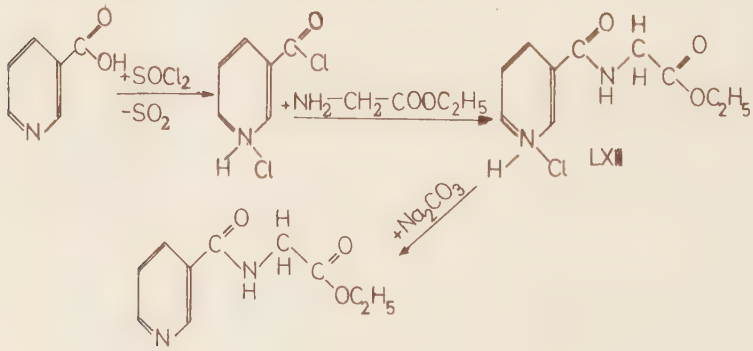


LXIV



8.2.1.1. Nicotinylglycinäthylester

Zur Darstellung des Nicotinylglycinäthylesters (LXIVa) wird im Vorversuch nach einem Verfahren von E. Späth (83.) die Nicotinsäure mit Thionylchlorid in das Nicotinylchloridhydrochlorid überführt, das dann mit Glycinäthylester-hydrochlorid in Chloroformlösung und unter Einwirkung der berechneten Menge Triäthylamin in Nicotinylglycinäthylesterhydrochlorid (LXIII) überführt wird. Diese wird dann in wäßriger Lösung unter Verwendung von Na_2CO_3-Lösung hydrolysiert.



1.) Vorschrift zu den Vorversuchen:

17,8 g (0,1 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid und 14,2 g (0,1 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid werden in 150 ml Chloroform unter Wasserkühlung suspendiert. Danach werden 20,2 g (0,2 Mol) Triäthylamin langsam unter Rühren portionsweise zugegeben. Es wird noch eine Stunde bei einer

Wasserbadtemperatur von 40 - 50°C gerührt, wobei ein gelblich gefärbter Niederschlag ausfällt. Die Reaktionsmischung bleibt nun über Nacht im Kühlschrank stehen. Dann wird vom Ausgefallenen abgesaugt und die Reaktionslösung mit Petroläther versetzt. Es fällt das Nicotinylglycinäthylester-hydrochlorid aus, das abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Ausbeute : 19,8 g Nicotinylglycinäthylester-hydrochlorid (80,9 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 175 - 182°C

Die obige Ausbeute an Nicotinylglycinäthylester-hydrochlorid (19,8 g) wird in Wasser gelöst, die wäßrige Lösung mit Sodawasser neutralisiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wird dann mit Wasser durch Schütteln gereinigt und mit Na_2SO_4 getrocknet und zu einem braunen Öl im Vakuum bei 45°C eingeengt, das nach einiger Zeit kristallisiert.

Ausbeute : 7,2 g Nicotinylglycinäthylester (34,6 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 58 - 60°C

2.) Vorschrift zu einem abgekürzten Verfahren:

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid und 7,1 g (0,05 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid werden in Chloroform unter Rühren suspendiert. Es wird dann unter Wasserkühlung 10,1 g (0,1 Mol) Triäthylamin zugetropft und noch eine Stunde bei 40 - 50°C gerührt. Die Lösung trübt sich und ein Niederschlag fällt aus, der abgesaugt wird. Die filtrierte Chloroformlösung wird nun 3 mal mit je 50 ml Sodawasser gewaschen und danach 2 mal mit je 50 ml Wasser geschüttelt. Danach wird mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es bleibt ein dunkelbraunes Öl zurück, das nicht kristallisierte und daher verworfen wurde.

3.) Endgültige Vorschrift für die Synthese unter Verwendung von Pyridin

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml absolutem Chloroform suspendiert. Danach werden 7,1 g (0,05 Mol) Glycinäthylester-hydrochlorid hinzugefügt und eine kurze Zeit stark gerührt. Nun kommen tropfenweise und unter Wasserkühlung 8 - 10 ml Pyridin hinzu, nach einigen Minuten nochmal die gleiche Menge. Es wird dann noch ca. 1 Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Die Lösung wird dann im Schütteltrichter 2 mal mit je 20 ml Wasser, 3 mal mit je 20 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und nochmal 2 mal mit je 20 ml Wasser geschüttelt und die Chloroformlösung mit Na_2SO_4 getrocknet. Dann wird diese bis zu einem dicken Sirup eingeengt und das restliche Pyridin mit Toluol abdestilliert. Der Rückstand wird nochmal in ca. 100 ml Chloroform gelöst, 5 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und wieder bis zur Kristallisation eingedampft.

Ausbeute : 5,7 g Nicotinylglycinäthylester (54,7 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 53 - 55°C Lit.: 54 - 55°C

Bruttoformel: $C_{10}H_{12}N_2O_3$

C	(gefunden)	57,60 %
	(berechnet)	57,68 %
H	(gefunden)	5,90 %
	(berechnet)	5,89 %
N	(gefunden)	13,30 %
	(berechnet)	13,45 %

Molgewicht : 208,225

8.2.1.2. Nicotinylalaninäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml absolutem Chloroform suspendiert. Danach werden 7,1 g (0,05 Mol) Alaninäthylester-hydrochlorid hinzugefügt und einige Zeit stark gerührt. Nun kommen tropfenweise und unter Wasserkühlung 8 - 10 ml Pyridin hinzu, nach einigen Minuten nochmal die gleiche Menge. Es wird dann längere Zeit gerührt und bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die Lösung wird dann im Schütteltrichter 2 mal mit je 20 ml Wasser, 3 mal mit je 20 ml gesättigter $NaHCO_3$-Lösung

und nochmal 2 mal mit je 20 ml Wasser geschüttelt und die Chloroformlösung mit Na_2SO_4 getrocknet. Dann wird diese bis zu einem dicken Sirup eingeengt und das restliche Pyridin mit Toluol wegdestilliert. Der Rückstand wird dann nochmal in ca. 100 ml Chloroform gelöst, 5 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und wieder bis zur Kristallisation bei Temperaturen bis 45°C eingedampft.

Ausbeute : 4,5 g Nicotinylalaninäthylester (40,5 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 48 - 50°C

Bruttoformel: $C_{11}H_{14}N_2O_3$

C	(gefunden)	58,70 %
	(berechnet)	59,45 %
H	(gefunden)	6,30 %
	(berechnet)	6,35 %
N	(gefunden)	12,70 %
	(berechnet)	12,60 %

Molgewicht : 222,246

8.2.1.3. Nicotinylmethioninäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml Chloroform suspendiert. Danach werden 11,4 g (0,05 Mol) Methioninäthylester-hydrochlorid hinzugefügt und weiter wie vorstehende Verbindung unter Verwendung von Pyridin umgesetzt.

Ausbeute : 3,5 g Nicotinylmethioninäthylester (24,02 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 57 - 60°C

Bruttoformel: $C_{13}H_{18}N_2O_3S \cdot 1/2H_2O$

C	(gefunden)	54,00 %
	(berechnet)	53,58 %
H	(gefunden)	6,70 %
	(berechnet)	6,57 %
N	(gefunden)	9,80 %
	(berechnet)	9,61 %

Molgewicht : 291,372

8.2.1.4. Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml Chloroform suspendiert. Danach werden 13,8 g (0,05 Mol) S-Benzyl-L-cysteinäthylester-hydrochlorid hinzugefügt und wie die vorstehende Verbindung unter Verwendung von Pyridin umgesetzt.

Ausbeute : 13,0 g Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester (75,2 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 118 - 119°C

Bruttoformel: $C_{18}H_{20}N_2O_3S$

C	(gefunden)	62,23 %
	(berechnet)	62,76 %
H	(gefunden)	6,20 %
	(berechnet)	5,85 %
N	(gefunden)	7,44 %
	(berechnet)	8,13 %

Molgewicht : 344,435

8.2.1.5. Nicotinylglutaminsäurediäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml Chloroform suspendiert. Danach werden 12,0 g (0,05 Mol) Glutaminsäurediäthylester-hydrochlorid hinzugefügt und weiter wie die vorstehende Verbindung unter Verwendung von Pyridin umgesetzt.

Ausbeute : 12,0 g Nicotinylglutaminsäurediäthylester· $1H_2O$ (73,54 % d. Th.)

Schmelzpunkt: öliges Produkt

Bruttoformel: $C_{15}H_{20}N_2O_5 \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	54,00 %
	(berechnet)	55,20 %
H	(gefunden)	6,30 %
	(berechnet)	6,79 %
N	(gefunden)	8,30 %
	(berechnet)	8,58 %

Molgewicht : 326,353

8.2.1.6. Nicotinyltryptophanäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml Chloroform suspendiert und mit 13,7 g (0,05 Mol) Tryptophanäthylester-hydrochlorid versetzt. Es wird dann weiter wie die vorstehende Verbindung unter Verwendung von Pyridin gearbeitet.

Ausbeute : 11,5 g Nicotinyltryptophanäthylester (68,1 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 123 - 124°C

Bruttoformel: $C_{19}H_{19}N_3O_3$

C	(gefunden)	67,80 %
	(berechnet)	67,64 %
H	(gefunden)	5,90 %
	(berechnet)	5,67 %
N	(gefunden)	11,60 %
	(berechnet)	12,46 %

Molgewicht : 337,381

8.2.1.7. Di - [nicotinyl] -lysinäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml Chloroform suspendiert, anschließend mit 6,2 g (0,025 Mol) Lysinäthylester-dihydrochlorid versetzt und wie die vorstehende Verbindung weiterverarbeitet.

Ausbeute : 4,2 g Di- [nicotinyl] -lysinäthylester (43,8 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 57 - 60°C

Bruttoformel: $C_{20}H_{24}N_4O_4$

C	(gefunden)	62,20 %
	(berechnet)	62,49 %
H	(gefunden)	6,60 %
	(berechnet)	6,29 %
N	(gefunden)	13,80 %
	(berechnet)	14,58 %

Molgewicht : 384,439

8.2.1.8. Nicotinyltyrosinäthylester

8,9 g (0,05 Mol) Nicotinylchloridhydrochlorid werden in 100 ml Chloroform suspendiert. Dazu kommen 12,3 g (0,05 Mol) Tyrosinäthylester-hydrochlorid. Die Reaktionsmischung wird unter Verwendung von Pyridin wie die vorhergehenden Verbindungen umgesetzt.

Ausbeute : 11,5 g Nicotinyltyrosinäthylester (73,5 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 143 - 144°C

Bruttoformel: $C_{17}H_{18}N_2O_4$

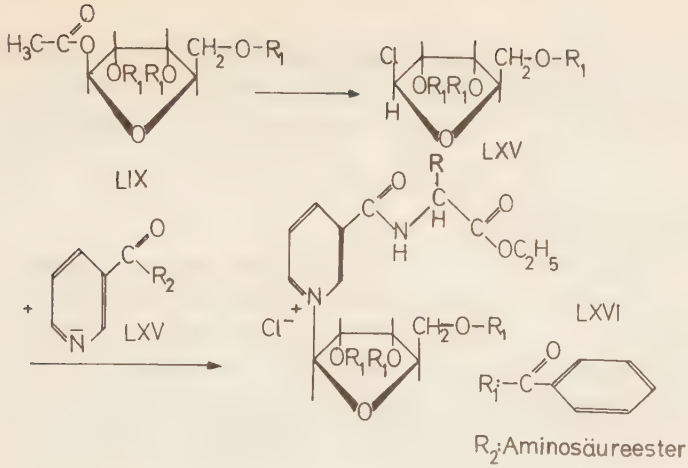
C	(gefunden)	63,65 %
	(berechnet)	64,95 %
H	(gefunden)	5,72%
	(berechnet)	5,77 %
N	(gefunden)	8,56 %
	(berechnet)	8,91 %

Molgewicht : 314,344

8.2.2. Vorschriften zur Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate

Die Darstellung der benzoylierten Nucleosid-Derivate mit einer -CONH- Gruppierung am C-3-Atom des Pyridinringes verlief analog nach einer Vorschrift von L.J. Haynes und J. Davoll (LXVI; 32.).

1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LIX) wurde in mit HCl-Gas gesättigtem Äther gelöst und durch Stehen im Kühlschrank in das 2.3.5-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosylchlorid bzw. 1-Chlor-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (LXV) überführt. Ohne weitere Aufarbeitung wurde diese Verbindung dann in einer bestimmten Menge Acetonitril gelöst und mit dem Nicotinylaminosäureäthylester (LXIV), ebenfalls gelöst in einer bestimmten Acetonitrilmenge, zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsprodukte wurden weiter aufgearbeitet. Die Ergebnisse werden in Tabellen wiedergegeben.



8.2.2.1. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylglycinäthylester zur Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (LXVII).

Zur Darstellung des beabsichtigten N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid wurde in zahlreichen Versuchen die allgemeine Vorschrift in Bezug auf die Menge der Lösungsmittel, die Konzentration und Molverhältnisse der Reaktionspartner und Reaktionszeit mit dem Ziel der größten Ausbeute und besten Analysenergebnisse verändert. Die engültige Vorschrift wird nach den vorhergehenden Versuchen, die als Vorversuche bezeichnet werden, am Schluß der Versuchsbeschreibung wiedergegeben (Tabellen 19, 20 und 21)

Vorversuche: Ansätze 3 - 13

Die ersten Ansätze (Ansatz 3 - 11 und 13) sind dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Kupplungskomponenten, 0,03 Mol 2.3.5-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosylchlorid und 6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester, in 50 ml - 150 ml bzw. 500 - 600 ml Acetonitril gelöst wurden und die Zuckerlösung zur Nicotinylglycinäthylester-Lösung gegeben wurde. Die Reaktionslösung blieb 7 Tage im Kühlschrank zur Reaktion stehen und wurde dann bis zu einem Sirup eingeengt. Dieser wurde dann in 50 ml Chloroform aufgenommen, abge-

kühlt und mit Äther das Reaktionsprodukt wie beschrieben gefällt. Es wurde bei diesen Ansätzen nur die in Essigester unlösliche Fraktion, die als Fraktion I bezeichnet wird gewonnen.

Vorschrift: Ansatz 6

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther gegeben. Die Lösung bleibt bis zur Lösung des Zuckers 7 Tage im Kühlschrank bei ca. 5°C stehen. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das im Vakuum verdampft wird. Das Produkt wird sofort weiterverarbeitet, wobei es in 50 ml Acetonitril gelöst wird.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 500 ml Acetonitril gelöst und im Eisbad abgekühlt. Dazu wird das erhaltene Tribenzoylribofuranosylchlorid, gelöst in 50 ml eiskaltem Acetonitril, gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage bei ca. 5°C im Kühlschrank stehen. Danach wird diese, da ein Niederschlag ausfällt, filtriert und sofort bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Dabei bleibt ein sirupöser Rückstand zurück. Dieser wird in 50 ml Chloroform aufgenommen, gelöst und im Kühlschrank abgekühlt. Anschließend wird mit kaltem Äther das Produkt durch Überschichten als ein schmieriger, zum Teil öliger Niederschlag ausgefällt, der in der Kälte teilweise kristallisiert. Das Lösungsmittelgemisch wird dann abdekantiert und der Rückstand mit Äther gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute	: 1,2 g Umsetzungsprodukt (16,47 % d. Th.)		
Schmelzpunkt:	169 - 175°C	C (gefunden)	50,90 %
		H (gefunden)	5,50 %
		Cl (gefunden)	14,00 %

Die Analyse läßt auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid als Produkt schließen (16,47 % der theoretischen Ausbeute).

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet) 49,09%
H (berechnet) 5,36 %
Cl (berechnet) 14,45 %

Molgewicht : 244,687

Vorschrift: Ansatz 3

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-^{O}-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther gegeben. Die Mischung bleibt zwecks Lösen des Zuckers 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird vom Ausgefallenen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das im Vakuum abgedampft wird. Der Rückstand wird sofort in 50 ml Acetonitril gelöst und weiterverarbeitet.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst und auf dem Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Dazu kommt das in Acetonitril gelöste Tribenzoylribofuranosylchlorid. Die Reaktionsmischung bleibt 12 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird diese filtriert und bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird nun mit 50 ml Chloroform aufgenommen, gelöst und abgekühlt. Durch Überschichten mit kaltem Äther fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der bald teilweise kristallisiert. Das Lösungsmittelgemisch wird dann abdekantiert, der Rückstand mit Äther gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 1,7 g Umsetzungsprodukt (23,33 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 165 - 170°C

C (gefunden) 49,30 %
H (gefunden) 5,50 %
N (gefunden) 11,20 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (23,33 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet)	49,09 %
H (berechnet)	5,36 %
N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Vorschrift: Ansatz 4

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und die Lösung bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird dann 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das im Vakuum abgezogen wird. Der Rückstand wird dann in 150 ml Acetonitril gelöst, das dann abgekühlt wird.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden dann in 600 ml Acetonitril auf dem Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Dazu kommt das in Acetonitril gelöste Tribenzoylribofuranosylchlorid. Die Reaktionsmischung bleibt nun 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann im Vakuum nach dem Filtrieren bei Zimmertemperatur eingedampft. Es bleibt ein sirupöser Rückstand, der in 50 ml Chloroform gelöst und gekühlt wird. Die kalte Lösung wird danach mit kaltem Äther überschichtet. Der schmierige Niederschlag wird nach dem teilweisen Kristallisieren und Abdekantieren des Lösungsmittelgemisches im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 1,2 g Umsetzungsprodukt (16,47 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 170 - 175°C

C (gefunden)	48,80 %
H (gefunden)	5,20 %
N (gefunden)	10,50 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (16,47 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet)	49,09 %
H (berechnet)	5,36 %
N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Vorschrift: Ansatz 7

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird vom Ausgefallenen abfiltriert und die Lösung bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das im Vakuum ebenfalls verdampft wird. Der Rückstand wird dann in 50 ml Acetonitril gelöst, das dann stark abgekühlt wird.

12,4 g (0,06 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden dann in 500 ml Acetonitril gelöst und auf dem Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Dazu wird nun die in Acetonitril gelöste Tribenzoylribofuranosylchlorid-Menge hinzugegeben. Die Reaktionsmischung bleibt nun 7 Tage im Kühlschrank stehen. Sie wird dann im Vakuum nach dem Filtrieren bei Zimmertemperatur eingedampft. Es bleibt ein sirupöser Rückstand, der in 50 ml Chloroform gelöst und danach abgekühlt wird. Die kalte Lösung wird dann mit kaltem Äther überschichtet. Der schmierige Niederschlag wird dann nach dem teilweisen Kristallisieren und Abdekantieren des Lösungsmittelgemisches im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 1,7 g Umsetzungsprodukt (11,67 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 164 - 170°C

C (gefunden)	49,00 %
H (gefunden)	5,60 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (11,67 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$ C (berechnet) 49,09 %
H (berechnet) 5,36 %

Molgewicht : 244,687

Vorschrift: Ansatz 12

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas auf dem Eisbad gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Abfiltrieren wird diese bei Zimmertemperatur unter Vakuum eingedampft und 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das gleichfalls unter Vakuum abgezogen wird. Der Rückstand wird in 500 ml Acetonitril gelöst.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 200 ml Acetonitril gelöst, abgekühlt und zu der Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann nach dem Abfiltrieren vom Ausgefallenen im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in 50 ml Chloroform gelöst und gekühlt. Die kalte Lösung wird dann mit kaltem Äther überschichtet. Der schmierige Niederschlag wird nach dem teilweisen Kristallisieren und Abdekantieren des Lösungsmittelgemisches im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 2,2 g Umsetzungsprodukt (15,10 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 180 - 183°C C (gefunden) 50,00 %
H (gefunden) 5,40 %
N (gefunden) 12,10 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (15,10 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$ C (berechnet) 49,09 %
H (berechnet) 5,36 %
N (berechnet) 11,45 %

Molgewicht : 244,687

Vorschrift: Ansatz 13

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas in Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Abfiltrieren wird diese im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das ebenfalls im Vakuum abgedampft wird. Danach wird der sirupöse Rückstand in 100 ml Acetonitril gelöst und abgekühlt.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 600 ml Acetonitril gelöst und auf dem Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Dazu kommt nun die Menge Tribenzoylribofuranosylchlorid, gelöst in 100 ml Acetonitril und abgekühlt, hinzu. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann nach dem Abfiltrieren vom Ausgefallenen im Vakuum eingeengt. Der sirupöse Rückstand wird dann in 50 ml Chloroform aufgenommen, gekühlt und mit kaltem Äther überschichtet. Der schmierige Niederschlag kristallisiert teilweise und wird nach Abdekantieren des Lösungsmittelgemisches und Waschen mit kaltem Äther im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 2,7 g Umsetzungsprodukt (37,06 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 178 - 183°C C (gefunden) -
H (gefunden) -

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (37,06 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$ C (berechnet) 49,09 %
H (berechnet) 5,36 %

Molgewicht : 244,687

Vorversuche: Ansätze 15 - 25 (Tabelle 20)

Die weiteren Ansätze 15 - 25 (Tabelle 20) ergaben eine zweite und manchmal eine dritte Fraktion, die durch vollständige Ausfällung und Auskristallisation des in Essigester gelösten Teils des Reaktionsproduktes erhalten wurden.

Vorschrift: Ansätze 15 und 16

450 ml Äther werden unter Eiskühlung mit HCl-Gas gesättigt und darin durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank 15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur das Filtrat eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das gleichfalls im Vakuum abgedampft wird. Das Produkt wird sofort weiterverarbeitet, wobei es in 100 ml Acetonitril gelöst wird.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 600 ml Acetonitril gelöst und im Eis-NaCl-Bad abgekühlt. Dazu wird das erhaltene Tribenzoylribofuranosylchlorid, gelöst in 100 ml Acetonitril, gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank bei ca. 5°C stehen. Danach wird diese, da ein Niederschlag ausfällt, filtriert und bei Zimmertemperatur im Vakuum eingeengt, wobei ein sirupöser Rückstand zurückbleibt. Dieser wird in 100 ml Chloroform gelöst und über Nacht stehen gelassen. Da kein Niederschlag ausfällt, wird die Lösung im Kühlschrank abgekühlt und anschließend mit kaltem Äther zwecks Ausfällung überschichtet. Es bildet sich eine Emulsionsschicht, aus der ein öliger Niederschlag ausfällt. Die Mischung wird zum Absetzen und Kristallisieren weiter im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, der Rückstand mit kaltem Äther nachdekantiert und dann mit ca. 50 ml Essigsäureäthylester behandelt, worin sich der größere Teil des Rückstandes löst. Der Teil, der ungelöst zurückbleibt, wird als Fraktion I bezeichnet. Die Essigesterlösung wird nach dem Abkühlen im Eis-NaCl-Bad ebenfalls mit kaltem Äther überschichtet, der Niederschlag einige Tage im Kühlschrank stehen gelassen, dann abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Dieser Teil ist dann Fraktion II, der in Essigester lösliche Teil.

Ansatz 15

Fraktion I

Ausbeute : 2,2 g Umsetzungsprodukt (30,19 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 180 - 182°C

C	(gefunden)	50,20 %
H	(gefunden)	5,50 %
N	(gefunden)	12,40 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochloride (30,19 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II

Ausbeute : 4,7 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (22,32 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 78 - 85°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	60,80 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	4,90 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,80 %
	(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149

Ansatz 16

Fraktion I

Ausbeute : 0,8 g Umsetzungsprodukt (10,98 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 170 - 174°C

C	(gefunden)	49,50 %
H	(gefunden)	5,50 %
N	(gefunden)	11,30 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (10,98 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II

Ausbeute : 1,1 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (5,22 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 70 - 75°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	60,20 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	5,10 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,50 %
	(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149

Vorversuche: Ansätze 19 bis 22

Die Ansätze 19 bis 22 gaben je drei Fraktionen:

Fraktion I: der aus der Chloroformlösung ausgefallene Teil
Fraktion II: der in Essigester unlösliche Teil
Fraktion III: der in Essigester gelöste und mit Äther ausgefällte Teil.

Vorschrift: Ansatz 19

15,0 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 450 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung ge-

sättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung vom Ausgefallenen filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Sirup wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das gleichfalls abdestilliert wird.Der sirupöse Rückstand wird daraufhin in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst.

2,1 g (0,01 Mol) Nicotinylglycinäthylester (1/3 der vorigen Menge) werden in 50 ml kaltem Acetonitril gelöst und zu dem in 600 ml Acetonitril gelösten Zucker gegeben. Die Lösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank bei ca. 5°C stehen und wird dann nach Abfiltrieren im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Der sirupöse Rückstand wird dann mit 100 ml Chloroform behandelt, wobei sich ein Niederschlag bildet, der als Fraktion I gewonnen wird. Die im Kühlschrank abgekühlte Chloroformlösung wird nach dem Filtrieren mit Äther überschichtet. Dabei fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der sich absetzt. Die obenstehende Lösungsmittelmischung wird dann abdekantiert und der Rückstand mit kaltem Äther nachdekantiert. Der Rückstand wird anschließend mit 50 ml Essigester behandelt. Der ungelöste Teil bleibt als Fraktion II zurück. Das Filtrat wird wieder abgekühlt und mit Äther behandelt, wodurch Fraktion III als der aus Essigester gefällte Teil erhalten werden kann. Alle drei Fraktionen werden im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ansatz 19

Fraktion I

Ausbeute : 0,7 g Umsetzungsprodukt (28,36 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 180 - 184°C

C (gefunden)	49,70 %
H (gefunden)	5,40 %
N (gefunden)	11,30 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (28,36 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet)	49,09 %
H (berechnet)	5,36 %
N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II

Ausbeute : 0,5 g Umsetzungsprodukt (20,26% d. Th.)

Schmelzpunkt: 183 - 187°C

C (gefunden)	50,00 %
H (gefunden)	5,20 %
N (gefunden)	13,60 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (20,26 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet)	49,09 %
H (berechnet)	5,36 %
N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion III

Ausbeute : 1,5 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (21,03 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 94 - 95°C

Bruttoformel: $C_{33}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	60,80 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	5,00 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,10 %
	(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,142

Vorschrift: Ansatz 20

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas auf dem Eisbad gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, dieses wird abdestilliert und der Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

3,1 g (0,015 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst, zu der in 500 ml kaltem Acetonitril gelösten Zuckerlösung gegeben und 7 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Die Weiterverarbeitung erfolgt wie im Ansatz 19.

Fraktion I (der aus Chloroform ausgefallene Teil)

Ausbeute : 1,0 g Umsetzungsprodukt (27,45 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 178 - 183°C

C (gefunden)	50,10 %
H (gefunden)	5,40 %
N (gefunden)	10,10 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (27,45 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C (berechnet)	49,09 %
H (berechnet)	5,36 %
N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 0,5 g Umsetzungsprodukt (13,72 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 172 - 178°C

C (gefunden)	50,30 %
H (gefunden)	5,20 %
N (gefunden)	13,10 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (13,72 % d. Th.)

Bruttoformel:	$C_{10}H_{13}ClN_2O_3$	C (berechnet)	49,09 %
		H (berechnet)	5,36 %
		N (berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion III (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 0,8 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (7,60% d. Th.)

Schmelzpunkt: 82 - 84°C

Bruttoformel:	$C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	C (gefunden)	59,80 %
		(berechnet)	61,15 %
		H (gefunden)	5,10 %
		(berechnet)	4,99 %
		N (gefunden)	4,40 %
		(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149

Vorschrift: Ansatz 21

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas auf dem Eisbad gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

2,1 g (0,01 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst und in der Kälte zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann filtriert und wie im vorstehenden Ansatz weiterverarbeitet.

Fraktion I (der im Chloroform ausgefallene Teil)

Ausbeute : 0,8 g Umsetzungsprodukt (32,41 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 168 - 171°C

C	(gefunden)	49,50 %
H	(gefunden)	5,40 %
N	(gefunden)	11,10 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (32,41 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 1,2 g Umsetzungsprodukt (48,62 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 148 - 150°C

N (gefunden) 8,20 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (48,62 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

N (berechnet) 11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion III (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 0,5 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (7,01 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 65 - 70°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,80 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	5,40 %
	(berechnet)	4,99 %

Molgewicht : 707,149

Vorschrift: Ansatz 22

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

2,1 g (0,01 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden nun in 50 ml Acetonitril gelöst und in der Kälte zu der Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann filtriert und wie im vorstehenden Ansatz weiterverarbeitet.

Fraktion I (der aus Chloroform ausgefallene Teil)

Ausbeute : 0,8 g Umsetzungsprodukt (32,41 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 170 - 173°C C (gefunden) 49,40 %
H (gefunden) 5,40 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (32,41 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$ C (berechnet) 49,09 %
H (berechnet) 5,36 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (der in Essigester ungelöste Teil)

Ausbeute : 0,7 g Umsetzungsprodukt (28,37 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 168 - 173°C C (gefunden) 49,10 %
H (gefunden) 5,30 %
N (gefunden) 10,90 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (28,37 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$ C (berechnet) 49,09 %
H (berechnet) 5,36 %
N (berechnet) 11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion III (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 1,4 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (19,63 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 93 - 95°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	60,79 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	4,90 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,20 %
	(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149

Die Ansätze 23 und 25 gaben je zwei Fraktionen: I, die in Essigester unlösliche und II, die in Essigester lösliche und mit Äther ausgefällte Fraktion. Die gefundenen Analysenwerte der Fraktionen II entsprechen annähernd den berechneten.

Vorschrift: Ansatz 23

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, danach filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 100 ml kaltem Acetonitril gelöst und in der Kälte zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt dann 7 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann filtriert und wie im vorstehenden Ansatz weiterverarbeitet. Aus der Chloroformlösung fällt kein Niederschlag aus.

Fraktion I (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 1,4 g Umsetzungsprodukt (19,21 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 165 - 175°C

C	(gefunden)	49,30 %
H	(gefunden)	5,40 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (19,21 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$ C (berechnet) 49,09 %
H (berechnet) 5,36 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 5,4 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (25,65 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 90 - 95°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$ C (gefunden) 61,10 %
(berechnet) 61,15 %
H (gefunden) 5,20 %
(berechnet) 4,99 %
N (gefunden) 4,30 %
(berechnet) 3,96 %

Molgewicht : 707,149

Vorschrift: Ansatz 25

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, dann filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 100 ml kaltem Acetonitril gelöst und in der Kälte zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann filtriert und wie im vorstehenden Ansatz weiterverarbeitet. Aus der Chloroformlösung fällt kein Niederschlag aus.

Fraktion I (in Essigester unlöslicher Teil)

Ausbeute : 0,3 g Umsetzungsprodukt (10,98 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 163 - 167°C

C	(gefunden)	50,20 %
H	(gefunden)	5,40 %
N	(gefunden)	10,30 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (10,98 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 12,4 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (58,89 % d.Th.)

Schmelzpunkt: 80 - 85°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	60,97 %
	(berechnet)	61,15 %
H	(gefunden)	5,20 %
	(berechnet)	4,99 %
N	(gefunden)	4,30 %
	(berechnet)	3,96 %
Cl	(gefunden)	5,30 %
	(berechnet)	5,01 %

Molgewicht : 707,149

Für die endgültige Vorschrift werden die Vorschriften der Ansätze 30 und 40 verwendet, welche die besten Analysenergebnisse zeigen. Die Fraktion des in Essigester unlöslichen Teils wird nicht mehr berücksichtigt.

Gültige Vorschrift:

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank bei

ca. 5°C gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Es wird der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das im Vakuum dann abgedampft wird. Der sirupöse Rückstand wird in 600 ml Acetonitril gelöst und tief gekühlt.

6,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gegeben, gelöst und der gekühlten Zuckerlösung zugegeben. Es wird mit 50 ml kaltem Acetonitril nachgespült. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen.

Nach dem Abfiltrieren vom Ausgefallenen wird die Lösung im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit 50 ml Chloroform aufgenommen. Die ebenfalls gekühlte Chloroformlösung wird dann mit kaltem Äther langsam überschichtet und dann durch Umrühren vermischt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der im Kühlschrank stehenbleibt. Dabei kristallisiert ein kleiner Teil aus. Es wird nun das Lösungsmittelgemisch vorsichtig abdekantiert und mit kaltem Äther nachdekantiert. Der sirupöse Rückstand wird in ca. 50 ml Essigester gelöst, wobei ein Teil unlöslich zurückbleibt, der nicht weiterverwendet wird. Die Essigesterlösung wird gleichfalls tief gekühlt, mit kaltem Äther überschichtet und durch Umrühren vermischt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der nach Stehen im Kühlschrank teilweise kristallin wird. Dieser wird abgesaugt, mit kaltem Äther ausgewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Es bleibt ein weißes, zum Teil amorphes und kristallines Pulver zurück, das hygroskopisch ist.

Ansatz 30

Ausbeute : 5,0 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (23,37 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 90 - 95°C

Bruttoformel:	$C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	C (gefunden)	61,40 %
		(berechnet)	61,15%
		H (gefunden)	5,70 %
		(berechnet)	4,99 %
		N (gefunden)	4,10 %
		(berechnet)	3,96%

Molgewicht : 707,149

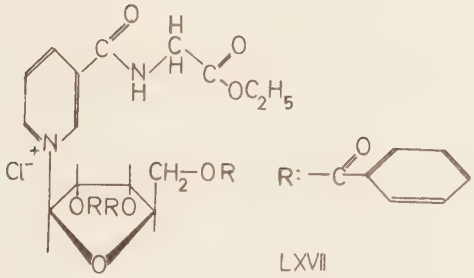
Ansatz 4 O

Ausbeute : 3,8 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (17,76 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 84 - 89°C

Bruttoformel:	$C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	C (gefunden)	61,18 %
		(berechnet)	61,15 %
		H (gefunden)	5,04 %
		(berechnet)	4,99 %
		N (gefunden)	4,09 %
		(berechnet)	3,96 %

Molgewicht : 707,149



LXVII

8.2.2.2. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylalaninäthylester zur Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid (LXVIII).

Zur Darstellung der obigen Verbindung wurde die allgemeine Vorschrift gleichfalls durch Vorversuche so variiert, um die besten Ausbeuten und Analysenergebnisse zu erhalten.

Eine endgültige Vorschrift wird am Schluß der Versuchsbeschreibungen über die Darstellung dieser Verbindung gegeben.

Vorversuche: Ansätze 3 bis 6

Vorschrift: Ansatz 3

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen wird diese Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird dann 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das gleichfalls im Vakuum abdestilliert wird, und anschließend in 100 ml Acetonitril gelöst und gekühlt.

6,7 g (0,03 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst, zu der die obige Zuckerlösung gegeben wird. Die Reaktionslösung bleibt dann 7 Tage im Kühlschrank stehen, wird vom Ausgefallenen filtriert und dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Der sirupöse Rückstand wird mit ca. 50 ml Chloroform aufgenommen. Es fällt kein Niederschlag aus. Nach Abkühlen wird die Lösung mit kaltem Äther überschichtet und anschließend umgerührt. Dabei fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach Absetzen desselben wird dieser mit ca. 50 ml Essigester behandelt, worin er sich vollständig löst. Die Essigesterlösung wird nach dem Abkühlen mit kaltem Äther wie vorher überschichtet und durch Umrühren vermischt. Der schmierige Niederschlag bleibt dann in der Kälte stehen. Das ausgefallene Produkt wird dann abgesaugt und mit kaltem Äther

nachgewaschen. Das Produkt wird im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ansatz 3

Ausbeute : 2,7 g Umsetzungsprodukt (34,6 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 56 - 60°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	56,20 %
	(berechnet)	61,62 %
H	(gefunden)	5,40 %
	(berechnet)	5,17 %
N	(gefunden)	10,20 %
	(berechnet)	3,88 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	51,07 %
H	(berechnet)	5,85 %
N	(berechnet)	10,83 %

Molgewicht : 258,714

Ansatz 4

Ausbeute : 4,1 g Umsetzungsprodukt (52,6 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 80 - 85°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	52,40 %
	(berechnet)	61,62 %
H	(gefunden)	6,10 %
	(berechnet)	5,17 %
N	(gefunden)	10,20 %
	(berechnet)	3,88 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	51,07 %
H	(berechnet)	5,85 %
N	(berechnet)	10,83 %

Molgewicht : 258,714

Ansatz 6

Ausbeute : 11,5 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 60 - 70°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (52,9 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	59,80 %
	(berechnet)	61,62 %
H	(gefunden)	5,40 %
	(berechnet)	5,17 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	51,07 %
H	(berechnet)	5,85 %

Molgewicht : 258,714

Vorversuche: Ansätze 7 bis 15

Vorschrift: Ansatz 7

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das ebenfalls im Vakuum verdampft wird, und danach in 500 ml Acetonitril gelöst.

6,7 g (0,03 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen Zuckerlösung hinzugegeben. Mit 100 ml Acetonitril wird nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Dann wird sie filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Die sirupöse Lösung wird nun mit ca. 50 ml Chloroform aufgenommen. Es fällt kein Niederschlag aus. Nach Abkühlen wird die Lösung mit Äther überschichtet, vermischt und zum Absetzen stehen gelassen. Das Lösungsmittelgemisch wird vom schmierigen Niederschlag abdekantiert. Der Rückstand wird dann in ca. 50 ml Essigester gelöst, wiederum stark abgekühlt und mit Äther gefällt. Der sirupöse Niederschlag wird dann abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ansatz 7

Ausbeute : 11,8 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 65 - 68°C

Bezogen auf das N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (54,3 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$ N (gefunden) 3,30 %
(berechnet) 3,88 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$ N (berechnet) 10,83 %

Molgewicht : 258,714

Vorschrift: Ansatz 8

10,1 g (0,02 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 350 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther bei 7-tägigem Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird dann filtriert, danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und anschließend in 350 ml kaltem

Acetonitril gelöst.

2,2 g (0,01 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst, zu der Zuckerlösung gegeben und mit 50 ml nachgespült. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank und wird wie im vorigen Ansatz weiterverarbeitet.

Ausbeute : 2,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 60 - 65°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (37,8 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$ N (gefunden) 6,20 %
(berechnet) 3,88 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$ N (berechnet) 10,83 %

Molgewicht : 258,714

Vorschrift: Ansatz 9

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, anschließend wird die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und danach in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst.

2,2 g (0,01 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie im vorhergehenden Ansatz weiterverarbeitet.

Ausbeute : 2,9 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 40 - 42°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (40,6% d. Th.)

Bruttoformel:	$C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$	C (gefunden)	57,80 %
		(berechnet)	61,62 %
		H (gefunden)	5,90 %
		(berechnet)	5,17 %
		N (gefunden)	6,10 %
		(berechnet)	3,88 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel:	$C_{11}H_{15}ClN_2O_3$	C (berechnet)	51,07 %
		H (berechnet)	5,85 %
		N (berechnet)	10,83 %

Molgewicht : 258,714

Vorschrift: Ansatz 15

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird filtriert, danach im Vakuum eingedampft, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das abdestilliert wird, und anschließend in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst.

6,7 g (0,03 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird im vorhergehenden Ansatz weiterverarbeitet.

Ausbeute : 11,1 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 72 - 76°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (51,1 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,40 %
	(berechnet)	61,62 %
H	(gefunden)	5,50 %
	(berechnet)	5,17 %

Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	51,07 %
H	(berechnet)	5,85 %
N	(berechnet)	10,83 %

Molgewicht : 258,714

Gültige Vorschrift:

Als gültige Vorschrift wird die vom Ansatz 15 verwendet, die aus diesen Ansätzen dieser Verbindung die besten Analysenergebnisse gab:

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen wird das Filtrat bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das ebenfalls im Vakuum eingedampft wird. Der Rückstand wird in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst.

6,7 g (0,03 Mol) Nicotinylalaninäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen kalten Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird nach der Filtration bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen. Es fällt kein Niederschlag aus. Nach dem Abkühlen der Lösung wird diese mit kaltem Äther überschichtet und vermischt, wobei ein sirupöser Niederschlag ausfällt. Nach Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Äther nachdekantiert. Der Rückstand wird nun mit ca. 50 ml Essigester behandelt, darin er sich vollständig löst. Die Essigester-

lösung wird nach Abkühlen mit Äther behandelt, das ausgefallene Produkt abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 11,1 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 72 - 76°C

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (51,1 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,40 %
	(berechnet)	61,62 %
H	(gefunden)	5,50 %
	(berechnet)	5,17 %

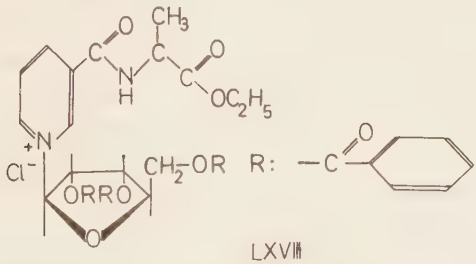
Molgewicht : 721,176

Bezogen auf das Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	51,07 %
H	(berechnet)	5,85 %

Molgewicht : 258,714



LXVIII

8.2.2.3. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylmethioninäthylester zur Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid (LXIX).

Analog dem Alanin-Derivat wurde auch diese Verbindung dargestellt:

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose wurden in mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther gelöst und das chlorierte Ribose-Derivat mit

Nicotinylmethioninäthylester ohne weitere Aufarbeitung gekuppelt. Es wurden zwei Fraktionen gewonnen, I, die in Essigester unlösliche, und II, die Essigester lösliche mit Äther gefüllte. Die Analysenwerte entsprechen zum Teil den berechneten, zum Teil dem Nicotinylmethioninäthylester-N^1 hydrochlorid.

Vorversuche

Vorschrift: Ansatz 1

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Reaktionslösung wird dann wegen ausgefallener Verunreinigungen filtriert, danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt und der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und in 100 ml Acetonitril gelöst.

8,4 g (0,03 Mol) Nicotinylmethioninäthylester werden in 600 ml Acetonitril gelöst, dem in der Kälte die obige Zukkerlösung zugegeben wird. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann vom Ausgefallenen abfiltriert und danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird dann in 50 ml Chloroform gelöst und nach dem Kühlen die Lösung mit kaltem Äther überschichtet. Nach Absetzen des schmierigen Niederschlages wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit Äther nachdekantiert und dann mit ca. 50 ml Essigester versetzt. Dabei bleibt ein Teil des Rückstandes zurück, der als Fraktion I bezeichnet wird. Das Filtrat wird wieder abgekühlt und ebenfalls mit kaltem Äther versetzt. Es fällt die Fraktion II aus, die ebenfalls wie die vorhergehende abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Ansatz 1

Fraktion I

Ausbeute : 2,8 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 105 - 108°C

C (gefunden) 49,40 %
H (gefunden) 5,80 %
N (gefunden) 6,30 %

Bezogen auf das Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid (29,52 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{13}H_{19}ClN_2O_3S$

C (berechnet) 48,98 %
H (berechnet) 6,01 %
N (berechnet) 8,78 %

Molgewicht : 318,834

Fraktion II

Ausbeute : 1,0 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 111 - 114°C

C (gefunden) 49,30 %
H (gefunden) 6,00 %
N (gefunden) 13,8 %

Bezogen auf das Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid (10,54 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{13}H_{19}ClN_2O_3S$

C (berechnet) 48,98 %
H (berechnet) 6,01 %
N (berechnet) 8,78 %

Molgewicht : 318,834

Vorschrift: Ansatz 5

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Filtrieren wird die Reaktionslösung im Vakuum eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und der Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

8,4 g (0,03 Mol) Nicotinylmethioninäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst und zur Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie im vorigen Ansatz weiterverarbeitet.

Fraktion I (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 3,4 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 116 - 118°C

C (gefunden)	48,80 %
H (gefunden)	6,40 %
N (gefunden)	8,50 %

Bezogen auf das Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid (35,85 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{13}H_{19}ClN_2O_3S$

C (berechnet)	48,98 %
H (berechnet)	6,01 %
N (berechnet)	8,78 %

Molgewicht : 318,834

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 4,3 g N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$ (17,93 % d.Th.)

Schmelzpunkt: schmieriges Produkt

Bruttoformel: $C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$

C	(gefunden)	55,00 %
	(berechnet)	58,60 %
H	(gefunden)	5,90 %
	(berechnet)	5,42 %
N	(gefunden)	5,50 %
	(berechnet)	3,50 %

Molgewicht : 799,312

Vorschrift: Ansatz 3

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-3-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas bei Kühlung gesättigtem Äther wie oben durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen wird die Reaktionslösung im Vakuum eingeengt, 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

4,2 g (0,015 Mol) Nicotinylmethioninäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst und zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Die Weiterverarbeitung erfolgt wie im vorigen Ansatz. Er-

halten wird nur eine Fraktion, die in Essigester lösliche und mit Äther ausgefällte.

Ausbeute : 3,0 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$ (25,23 % d.Th.)

Schmelzpunkt: schmieriges Produkt

Bruttoformel: $C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$

C	(gefunden)	54,60 %
	(berechnet)	58,60 %
H	(gefunden)	5,60 %
	(berechnet)	5,42 %

Molgewicht : 799,312

Vorschrift: Ansatz 11

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden durch 7-tägiges Stehen in 500 ml mit HCl-Gas unter Eiskühlung gesättigtem Äther im Kühlschrank gelöst, nach dem Abfiltrieren dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Nach dreimaliger Zugabe von je 30 ml Benzol und Destillation wird der Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

2,8 g (0,01 Mol) Nicotinylmethioninäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zur Zuckerlösung zugegeben. Die Lösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird wie im vorigen Ansatz weiterverarbeitet. Erhalten wird die aus Essigester mit Äther gefällte Fraktion.

Ausbeute : 2,2 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: schmieriges Produkt

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$ (27,73 % d. Th.)

Bruttoformel:	$C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$	C (gefunden)	55,56 %
		(berechnet)	58,60 %
		H (gefunden)	5,76 %
		(berechnet)	5,42%
		N (gefunden)	5,40 %
		(berechnet)	3,50 %
		Cl (gefunden)	7,00 %
		(berechnet)	4,44 %

Molgewicht : 799,312

Bezogen auf das Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel:	$C_{13}H_{19}ClN_2O_3S$	C (berechnet)	48,98%
		H (berechnet)	6,01 %
		N (berechnet)	8,78 %

Molgewicht : 318,834

Vorschrift: Ansatz 13

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas bei Eiskühlung gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, danach bei Zimmertemperatur im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird dann 3 mal mit je 30 ml Benzol nachträglich gelöst und jedesmal das Benzol im Vakuum abgedampft. Der Sirup wird anschließend in 500 ml Acetonitril aufgenommen.

2,8 g (0,01 Mol) Nicotinylmethioninäthylester, gelöst in 100 ml Acetonitril, werden der obigen Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank und wird wie im vorigen Ansatz weiterverarbeitet. Erhalten wird die in Essigester lösliche und mit Äther ausgefällte Fraktion.

Ausbeute : 3,1 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: schmieriges Produkt

Bezogen auf das N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$ (39,11 % d. Th.)

Bruttoformel:	$C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$	C (gefunden)	53,00 %
		(berechnet)	58,60 %
		H (gefunden)	5,80 %
		(berechnet)	5,42 %
		N (gefunden)	6,30 %
		(berechnet)	3,50 %
		Cl (gefunden)	7,70 %
		(berechnet)	4,44 %

Molgewicht : 799,312

Bezogen auf das Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel:	$C_{13}H_{19}ClN_2O_3S$	C (berechnet)	48,98 %
		H (berechnet)	6,01 %
		N (berechnet)	8,78 %

Molgewicht : 318,834

Gültige Vorschrift nach Ansatz 12:

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung im Vakuum eingedampft, 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das gleichfalls abdestilliert wird. Der sirupöse Rückstand wird anschließend in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst.

8,4 g (0,03 Mol) Nicotinylmethioninäthylester, gelöst in 100 ml Acetonitril, werden zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann nach Abfiltrieren von Verunreinigungen im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird dann in 50 ml Chloroform gelöst und abgekühlt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit kaltem Äther überschichtet. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das

Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit Äther nachdekantiert und dann in ca. 50 ml Essigester gelöst. Dabei löst sich das Produkt. Die Lösung wird wieder abgekühlt und mit kaltem Äther behandelt. Es fällt wieder ein schmieriger Niederschlag aus, der in der Kälte nur zum Teil kristallisiert.

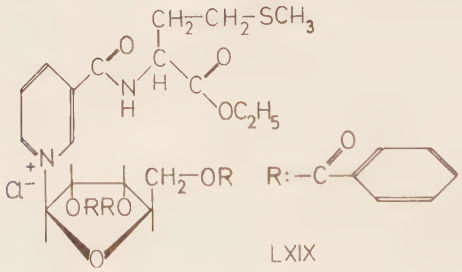
Ausbeute : 3,1 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$ (23,73 % d.Th.)

Schmelzpunkt: schmieriges Produkt

Bruttoformel: $C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$

C	(gefunden)	57,30 %
	(berechnet)	58,60 %
H	(gefunden)	5,70 %
	(berechnet)	5,42%
N	(gefunden)	4,50%
	(berechnet)	3,50%

Molgewicht : 799,312



LXIX

2.2.2.4. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester zur Darstellung des N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorids (LXX)

Als besondere Verbindung dieser Art wurde versucht, das Reaktionsprodukt des Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylesters mit 1-Chlor-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (dargestellt durch Chlorierung des Ausgangsprodukts mit HCl in Äther) zu synthetisieren. Es wurde als Ausgangsverbindung das benzylierte Cystein verwendet, dessen SH-Grup-

pe durch die Benzylgruppe geschützt wird. Es wurden mehrere Vorversuche durchgeführt.

Vorversuche

Vorschrift: Ansatz 1

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther gegeben und durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abgesaugt und die Lösung im Vakuum bis zum sirupösen Rückstand eingeengt. Der Rückstand wird danach 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das ebenfalls abdestilliert wird, und anschließend in 300 ml kaltem Acetonitril gelöst.

11,5 g (0,03 Mol) Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester werden unter Erwärmen in 300 ml Acetonitril gelöst. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur kommt diese Lösung zu der kalten Zuckerlösung und bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Es wird dann vom Ausgefallenen abfiltriert und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der sirupöse Rückstand wird dann in ca. 40 ml Chloroform gelöst, stark abgekühlt und mit Äther überschichtet und dann unter Umrühren vermischt. Nach Absetzen des sirupösen Niederschlages wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und dann mit Essigester versetzt. Der Rückstand löst sich in Essigester, das dann abgekühlt und mit kaltem Äther versetzt wird. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus.

Ausbeute : 6,8 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt:	sirupöses Produkt	C (gefunden)	53,50 %
		H (gefunden)	5,73 %
		N (gefunden)	5,34 %
		S (gefunden)	6,28 %

Bezogen auf das Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^{π}-hydrochlorid (53,5 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$

C	(berechnet)	56,76 %
H	(berechnet)	5,55 %
N	(berechnet)	7,35 %
S	(berechnet)	8,42 %

Molgewicht : 380,905

Vorschrift: Ansatz 2

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranse werden in 600 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, danach filtriert, 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt und schließlich in 300 ml kaltem Acetonitril gelöst.

11,5 g (0,03 Mol) Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester werden unter Erwärmen in 300 ml Acetonitril gelöst. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird diese Lösung zu der Zuckerlösung zugegeben. Das Lösungsmittelgemisch bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie im vorherigen Ansatz weiterverarbeitet.

Ausbeute : 6,4 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: sirupöses Produkt

C	(gefunden)	56,80 %
H	(gefunden)	5,82%
N	(gefunden)	5,40%
S	(gefunden)	6.35 %

Bezogen auf das Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-hydrochlorid (50,35 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$

C	(berechnet)	56,76 %
H	(berechnet)	5,55 %
N	(berechnet)	7,35 %
S	(berechnet)	8,42 %

Molgewicht : 380,905

Vorschrift: Ansatz 3

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Da-

nach wird filtriert und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol nachdestilliert und dann in 300 ml Acetonitril gelöst.

11,5 g (0,03 Mol) Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester werden in 300 ml Acetonitril unter Erwärmen gelöst und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur zu der kalten Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 14 Tage im Kühlschrank stehen und wird wie der Ansatz 2 aufgearbeitet.

Ausbeute : 3,8 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt:	46 - 47°C	C (gefunden)	57,88 %
		H (gefunden)	5,12 %
		N (gefunden)	5,17 %
		S (gefunden)	5,02 %

Bezogen auf das Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel:	$C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$	C (berechnet)	56,76 %
		H (berechnet)	5,55 %
		N (berechnet)	7,35 %
		S (berechnet)	8,42 %

Molgewicht : 380,905

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid $1H_2O$ (15,35 % d. Th.)

Bruttoformel:	$C_{44}H_{41}N_2O_{10}ClS \cdot 1H_2O$	C (berechnet)	62,67 %
		H (berechnet)	5,14 %
		N (berechnet)	3,32 %
		S (berechnet)	3,80 %

Molgewicht : 843,37

Gültige Vorschrift: **Ansatz 4**

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, dann von ausgefallenen Verunreinigungen gelöst, der Rückstand nach Eindampfen der Lösung im Vakuum 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt und dann in 300 ml Acetonitril gelöst.

11,5 g (0,03 Mol) Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester werden unter Erwärmen in 300 ml Acetonitril gelöst und dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Diese Esterlösung wird dann zu der stark gekühlten Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt dann 14 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in ca. 40 ml Chloroform gelöst, stark abgekühlt und das Produkt durch Eingießen in kalten Äther ausgefällt. Nach Absetzen des sirupösen Niederschlages wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit Äther nachdekantiert und anschließend in Essigester gelöst. Die Essigesterlösung wird gleichfalls stark abgekühlt und in Äther eingegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 9,4 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt:	56 - 58°C	C (gefunden)	59,10 %
		H (gefunden)	5,46 %
		N (gefunden)	4,91 %
		S (gefunden)	5,53 %

Bezogen auf das Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel:	$C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$	C (berechnet)	56,76 %
		H (berechnet)	5,55 %
		N (berechnet)	7,35 %
		S (berechnet)	8,42 %

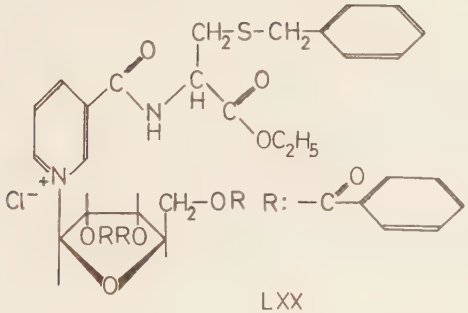
Molgewicht : 380,905

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (37,96 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{44}H_{41}N_2O_{10}ClS \cdot 1H_2O$

C	(berechnet)	62,67 %
H	(berechnet)	5,14 %
N	(berechnet)	3,32 %
S	(berechnet)	3,80 %

Molgewicht : 843,37



LXX

8.2.2.5. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylglutaminsäurediäthylester zur Darstellung des N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorids (LXXI).

Diese Verbindung wurde analog der vorherigen Verbindungen dargestellt. Es wurden zunächst wie für die anderen Verbindungen mehrere Vorversuche durchgeführt.

Vorversuche

Vorschrift: Ansatz 3

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, danach von ausgefallenen Verunreinigungen filtriert und bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das gleichfalls im Vakuum abdestilliert wird, und anschließend in 100 ml Acetonitril gelöst.

9,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglutaminsäurediäthylester werden in 500 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der sirupöse Rückstand wird nun in 100 ml Chloroform gelöst, stark abgekühlt und mit Äther überschichtet, der dann umgerührt wird. Nach Absetzen des Niederschlages wird vom Lösungsmittel abdekantiert, mit Äther nachgewaschen und der Rückstand mit 50 ml Essigester behandelt, wodurch sich ein Teil nicht löst. Dieser wird abgesaugt und als Fraktion I behandelt. Das Filtrat wird wieder abgekühlt und mit kaltem Äther überschichtet und umgerührt. Die schmierig-ölige Substanz wird dann abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet, wodurch sie fest wird. Dieser Teil wird als Fraktion II behandelt.

Ansatz 3

Fraktion I

Ausbeute : 1,5 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 78 - 80°C

C (gefunden)	52,20 %
H (gefunden)	6,70 %
N (gefunden)	8,10 %

Bezogen auf das Nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-hydrochlorid (14,42 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{15}H_{21}ClN_2O_5$

C (berechnet)	52,25 %
H (berechnet)	6,14 %
N (berechnet)	8,12 %

Molgewicht : 344,803

Fraktion II

Ausbeute : 7,1 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 45 - 50°C

C (gefunden)	54,60 %
H (gefunden)	5,90 %
N (gefunden)	6,30 %

Bezogen auf das Nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-hydrochlorid (68,27 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{15}H_{21}ClN_2O_5$

C	(berechnet)	52,25 %
H	(berechnet)	6,14 %
N	(berechnet)	8,12 %

Molgewicht : 344,806

Vorschrift: Ansatz 6

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das abdestilliert wird, und anschließend in 500 ml Acetonitril gelöst.

9,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglutaminsäurediäthylester werden dann in 100 ml Acetonitril gelöst, das zur obigen kalten Zuckerlösung zugegeben wird. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie im vorigen Ansatz weiterverarbeitet. Der aus Chloroform mit Äther gefällte Niederschlag löst sich vollständig im Essigester. Es wird nun der aus dem Essigester mit Äther gefällte Teil erhalten.

Ausbeute : 3,4 g N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (13,96 % d. Th.)

Schmelzpunkt: sirupöses Produkt

Bruttoformel: $C_{41}H_{41}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	59,90 %
	(berechnet)	61,00 %
H	(gefunden)	5,70 %
	(berechnet)	5,37 %
N	(gefunden)	4,60 %
	(berechnet)	3,47 %

Molgewicht : 307,268

Vorschrift: Ansatz 7

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden wie im vorhergehenden Ansatz in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Das Lösungsmittel wird nach Filtrieren im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft; 3 mal mit je 30 ml Benzol wird der sirupöse Rückstand behandelt, das abdestilliert wird, und anschließend in 500 ml Acetonitril gelöst.

3,1 g (0,01 Mol) Nicotinylglutaminsäurediäthylester werden nun in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der stark abgekühlten obigen Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie im vorigen Ansatz weiterverarbeitet. Es wird nur der aus Essigester mit Äther gefällte Teil erhalten.

Ausbeute : 2,7 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester · $1H_2O$ (33,27 % d. Th.)

Schmelzpunkt: sirupöses Produkt

Bruttoformel:	$C_{41}H_{41}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$	C	(gefunden)	57,33 %
			(berechnet)	61,00 %
		H	(gefunden)	5,75 %
			(berechnet)	5,37 %
		N	(gefunden)	4,80 %
			(berechnet)	3,47 %

Molgewicht : 807,238

Gültige Vorschrift nach Ansatz 9

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung von ausgefallenen Verunreinigungen filtriert und bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol behandelt, das ebenfalls verdampft wird. Dieser wird dann in 500 ml Acetonitril gelöst.

9,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglutaminsäurediäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zur obigen stark abgekühlten Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird in 100 ml Chloroform aufgenommen und abgekühlt. Das Produkt wird durch Überschichten und Vermischen mit kaltem Äther ausgefällt. Nach dem Absetzen wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Äther nachdekantiert. Danach werden ca. 50 ml Essigester hinzugegeben, worin sich der Niederschlag voll löst. Die Lösung wird wieder abgekühlt und mit Äther behandelt. Es fällt ein schmierig-öliger Niederschlag aus, der im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

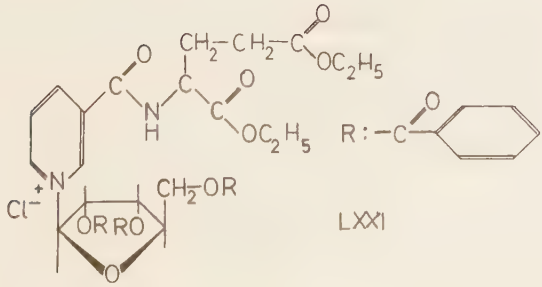
Ausbeute : 13,4 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (55,03 % d. Th.)

Schmelzpunkt: sirupöses Produkt

Bruttoformel: $C_{41}H_{41}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	59,40 %
	(berechnet)	61,00 %
H	(gefunden)	5,52 %
	(berechnet)	5,37 %
N	(gefunden)	3,30 %
	(berechnet)	3,47 %
Cl	(gefunden)	5,40 %
	(berechnet)	4,34 %

Molgewicht : 807,268



LXXI

8.2.2.6. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinyltryptophanäthylester zur Darstellung des N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorids (LXXII).

Das Tryptophan-Derivat wurde analog der vorherigen Verbindungen dargestellt. Es gab drei Fraktionen: I, der aus der Chloroformlösung ausgefallene Teil, II, der in Essigester unlösliche Teil, und III, in Essigester löslicher mit Äther ausgefällter Teil.

Vorversuche

Vorschrift: Ansatz 2

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol aufgenommen und das Lösungsmittel ebenfalls im Vakuum verdampft, und anschließend wird der Sirup in 50 ml Acetonitril gelöst.

10,1 g (0,03 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 600 ml Acetonitril gelöst, danach stark abgekühlt und zu der obigen Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen filtriert und das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in 50 ml Chloroform aufgenommen und in der Kälte mit Äther versetzt. Es fällt ein Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Äther nachdekantiert. Der Rückstand wird mit 50 ml Essigester versetzt, worin sich ein Teil löst. Der unlösliche Teil wird abgesaugt. Das Filtrat wird in der Kälte mit Äther versetzt. Es fällt die Fraktion III, die abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird, aus.

Fraktion I (der aus der Chloroformlösung ausgefallene Teil)

Ausbeute : 5,3 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 196 - 198°C

C	(gefunden)	60,90 %
H	(gefunden)	5,50 %
N	(gefunden)	11,00 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (47,36 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C	(berechnet)	61,04 %
H	(berechnet)	5,39 %
N	(berechnet)	11,24 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion II (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 1,2 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 192 - 198°C

C	(gefunden)	60,90 %
H	(gefunden)	5,30 %
N	(gefunden)	11,80 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (10,72 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C	(berechnet)	61,04 %
H	(berechnet)	5,39 %
N	(berechnet)	11,24 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion III (der in Essigester lösliche mit Äther ausgefällte Teil)

Ausbeute : 3,6 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 104 - 108°C

C	(gefunden)	60,40 %
H	(gefunden)	5,20 %
N	(gefunden)	7,40 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (32,17 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C (berechnet) 61,04%
H (berechnet) 5,39%
N (berechnet) 11,24%

Molgewicht : 373,850

Für die Ansätze 5 bis 8 wurden die Reaktionsbedingungen verändert:

Vorschrift: Ansatz 5

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Reaktionslösung filtriert, das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol aufgenommen, das abgedampft wird, und anschließend in 250 ml Acetonitril gelöst.

10,2 g (0,03 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 250 ml kaltem Acetonitril gelöst, zu der obigen Zuckerlösung gegeben und mit 100 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird diese im Vakuum eingeengt und der sirupöse Rückstand in 50 ml Chloroform aufgenommen und abgekühlt. Die Lösung wird danach mit Äther überschichtet, wobei ein Niederschlag ausfällt. Nach dessen Absetzen wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und der Rückstand mit 50 ml Essigester versetzt und stehengelassen. Der ungelöste Teil wird abfiltriert. Aus der Essigesterlösung wird nach Abkühlen durch erneute Zugabe von kaltem Äther ein weiterer Teil, die Fraktion II, ausgefällt.

Fraktion I (der in Essigester ungelöste Teil)

Ausbeute : 13,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 125 - 128°C

C (gefunden) 61,30 %
H (gefunden) 5,00 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C (berechnet) 61,04%
H (berechnet) 5,39 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion II (der in Essigester gelöste Teil)

Ausbeute : 0,3 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (1,18 % d.Th.)

Schmelzpunkt: 105 - 120°C

Bruttoformel: $C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	64,40 %
	(berechnet)	64,63%
H	(gefunden)	5,50 %
	(berechnet)	5,06 %
N	(gefunden)	6,30 %
	(berechnet)	5,02 %

Molgewicht : 836,312

Vorschrift: Ansatz 6

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden wie im vorherigen Ansatz in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther gelöst, im Vakuum eingeengt, mit Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 250 ml Acetonitril gelöst.

3,4 g (0,01 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 250 ml Acetonitril gelöst und wie im vorherigen Ansatz nach 7-tägigem Stehen der Reaktionslösung im Kühlschrank weiterverarbeitet.

Fraktion I (in Essigester ungelöster Teil)

Ausbeute : 2,8 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 102 - 108°C

C	(gefunden)	60,45 %
H	(gefunden)	5,95 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (74,32 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C	(berechnet)	61,04 %
H	(berechnet)	5,39 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 0,3 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 100 - 108°C

C (gefunden)	60,14 %
H (gefunden)	5,43 %
N (gefunden)	6,69 %

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$

C (berechnet)	64,63 %
H (berechnet)	5,06 %
N (berechnet)	5,02 %

Molgewicht : 836,212

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (7,96 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C (berechnet)	61,04 %
H (berechnet)	5,39 %
N (berechnet)	11,24 %

Molgewicht : 373,850

Vorschrift: Ansatz 7

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden wie im vorherigen Ansatz in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther gelöst, im Vakuum eingeengt, mit Benzol nachdestilliert und in 250 ml Acetonitril aufgenommen.

10,2 g (0,03 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 250 ml Acetonitril gelöst und zu der Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird diese eingedampft und der Rückstand mit 50 ml Chloroform aufgenommen, wobei nach Abkühlen ein Niederschlag ausfällt, der abfiltriert wird. Das Filtrat wird nun mit kaltem Äther behandelt. Der Niederschlag wird nach dem

Abdekantieren des Äthers mit Essigester behandelt. Dabei löst sich ein Teil. Der Rückstand ist Fraktion II. Aus der Essigesterlösung wird Fraktion III durch Fällen mit Äther in der Kälte gewonnen.

Fraktion I (der aus der Chloroformlösung ausgefallene Teil)

Ausbeute : 2,8 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 132 - 134°C C (gefunden) 60,00 %
H (gefunden) 5,10 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (24,77 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$ C (berechnet) 61,04%
H (berechnet) 5,39 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion II (der in Essigester ungelöste Teil)

Ausbeute : 11,0 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 125 - 128°C C (gefunden) 61,60 %
H (gefunden) 5,20 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (97,33 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$ C (berechnet) 61,04 %
H (berechnet) 5,39 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion III (der in Essigester gelöste Teil)

Ausbeute : 0,9 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (3,56 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 120 - 122°C

Bruttoformel: $C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$ C (gefunden) 63,60 %
(berechnet) 64,63 %
H (gefunden) 5,00 %
(berechnet) 5,06 %

Molgewicht : 836,312

Vorschrift: Ansatz 8

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, filtriert, dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, mit Benzol nachdestilliert und der sirupöse Rückstand in 250 ml kaltem Acetonitril aufgenommen.

3,4 g (0,01 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 250 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen Zuckerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie oben eingeengt. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und abgekühlt. Ein Niederschlag fällt dabei aus. Das Filtrat wird dann wie im vorherigen Ansatz weiterverarbeitet. Es werden drei Fraktionen erhalten.

Fraktion I (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 1,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 132 - 135°C C (gefunden) 54,60 %
H (gefunden) 5,00 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (45,12 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$ C (berechnet) 61,04 %
H (berechnet) 5,39 %

Molgewicht : 373,850

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 2,1 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 105 - 118°C

C (gefunden)	60,29 %
H (gefunden)	5,45 %
N (gefunden)	7,51 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid (55,74 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$

C (berechnet)	61,04 %
H (berechnet)	5,39 %
N (berechnet)	11,24 %

Molgewicht : 373,850

Gültige Vorschrift nach Ansatz 5

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Reaktionslösung filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird dann 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das jedesmal im Vakuum abgezogen wird. Der sirupöse Rückstand wird dann in 250 ml Acetonitril gelöst.

10,2 g (0,03 Mol) Nicotinyltryptophanäthylester werden in 250 ml kaltem Acetonitril gelöst, zu der obigen Zuckerlösung zugegeben und mit 100 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird diese im Vakuum eingedampft und der sirupöse Rückstand in 50 ml Chloroform aufgenommen und abgekühlt. Die Lösung wird dann mit Äther überschichtet und vermischt. Dabei fällt ein Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und der Rückstand in 50 ml Essigester gelöst, wobei ein Teil ungelöst zurückbleibt (Fraktion I). Aus der Essigesterlösung wird in der Kälte die Fraktion II mit kaltem Äther gefällt.

Fraktion I (der in Essigester ungelöste Teil)

Ausbeute : 13,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 125 - 128°C

C (gefunden)	61,30 %
H (gefunden)	5,00 %

Bezogen auf das Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$ C (berechnet) 61,04 %
H (berechnet) 5,39 %

Molgewicht : 373,850

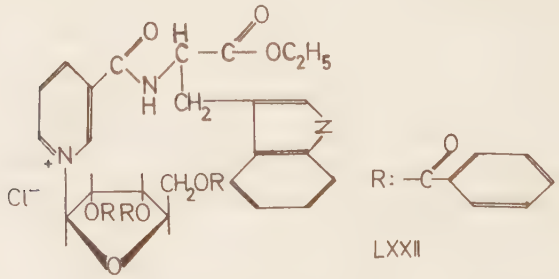
Fraktion II (der in Essigester gelöste Teil)

Ausbeute : 0,3 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (1,18 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 105 - 120°C

Bruttoformel: $C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$ C (gefunden) 64,40 %
(berechnet) 64,63 %
H (gefunden) 5,50 %
(berechnet) 5,06 %
N (gefunden) 6,30 %
(berechnet) 5,02 %

Molgewicht : 836,312



8.2.2.7. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Di-[nicotinyl]-lysinäthylester zur Darstellung des Di-{N^1-[2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]nicotinyl}lysinäthylester-di-N^1-chlorids (LXXIII).

Als besondere Verbindung dieser Reihe wurde versucht, das Lysin-Derivat Di-{N^1-[2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl}-lysinäthylester-di-N^1-chlorid darzustellen, das im Molekül zwei Nicotinylgruppen besitzt. Die Ester-

komponente Di- [nicotinyl] -lysinäthylester kuppelt daher mit zwei Molekülen des 2.3.5-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosylchlorids und wurde daher nur in halber Menge oder in entsprechend variierten Mengenverhältnissen eingesetzt.

Vorversuche

Vorschrift: Ansatz 1

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert, die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft und der sirupöse Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das abdestilliert wird, anschließend wird dieser in 500 ml Acetontril aufgenommen und gelöst.

5,8 g (C,015 Mol) Di- [nicotinyl] -lysinäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der abgekühlten Zuckerlösung hinzugegeben, anschließend wird mit 100 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Danach wird sie filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird mit Chloroform aufgenommen und mit Äther in der Kälte gefällt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit Äther nachgewaschen und der Rückstand mit Essigester behandelt. Der Niederschlag löst sich nicht in Essigester. Er wird abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 8,7 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 95 - 104°C

C	(gefunden)	59,90 %
H	(gefunden)	5,50 %
N	(gefunden)	5,80 %

Bezogen auf das Di- [nicotinyl] -lysinäthylester-di-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_4$ C (berechnet) 52,52 %
H (berechnet) 5,73 %
N (berechnet) 12,25 %

Molgewicht : 457,374

Bezogen auf das Di- {N^1- [2'.3'.5'-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] nicotinyl } -lysinäthylester-di-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{72}H_{66}Cl_2N_4O_{18} \cdot 1H_2O$ C (berechnet) 63,40 %
H (berechnet) 5,03%
N (berechnet) 4,11 %

Molgewicht : 1364,29

Vorschrift: Ansatz 3

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden wie im vorherigen Ansatz in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Nach dem Filtrieren wird die Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft, der Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol versetzt, das abdestilliert wird, und dann in 500 ml Acetonitril gelöst.

5,8 g (0,015 Mol) Di- [nicotinyl] -lysinäthylester werden nun in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie die von Ansatz 1 weiterverarbeitet.

Ausbeute : 9,0 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 95 - 102°C C (gefunden) 59,10 %
H (gefunden) 5,00 %
N (gefunden) 5,70 %

Bezogen auf das Di-[nicotinyl]-lysinäthylester-di-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_4$ C (berechnet) 52,52 %
H (berechnet) 5,73 %
N (berechnet) 12,25 %

Molgewicht : 457,374

Bezogen auf das Di- {N^1- [2'.3'.5'-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl} -lysinäthylester-di-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{72}H_{66}Cl_2N_4O_{18} \cdot 1H_2O$

C	(berechnet)	63.40 %
H	(berechnet)	5,03 %
N	(berechnet)	4,11 %

Molgewicht : 1364,29

Vorschrift: Ansatz 4

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden wie im vorherigen Ansatz in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird vom Ausgefallenen abfiltriert, das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft und der Rückstand wie oben mit Benzol behandelt, das abdestilliert wird. Anschließend wird der sirupöse Rückstand in 500 ml Acetonitril gelöst.

1,92 g (0,005 Mol) Di- [nicotinyl] -lysinäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der obigen kalten Zukkerlösung gegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann wie im Ansatz 3 weiterverarbeitet.

Ausbeute : 1,6 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 60 - 62°C

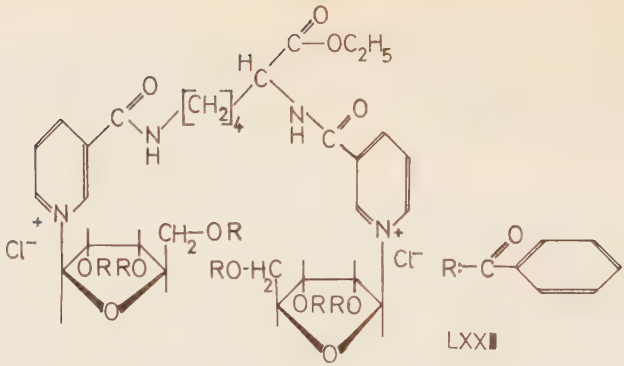
C	(gefunden)	53,10 %
H	(gefunden)	5,60 %
N	(gefunden)	10,50 %

Bezogen auf das Di- [nicotinyl] -lysinäthylester-di-N^1-hydrochlorid (70,05 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_4$

C	(berechnet)	52,52 %
H	(berechnet)	5,73 %
N	(berechnet)	12,25 %

Molgewicht : 457,374



LXXI

8.2.2.8. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinyltyrosinäthylester zur Darstellung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltyrosinäthylester-N^1-chlorid (LXXIV).

Diese Verbindung wurde analog durch Kupplung der Zuckerkomponente mit der Esterkomponente Nicotinyltyrosinäthylester, einer aromatischen Aminosäure, dargestellt.

Vorversuch

Vorschrift: Ansatz 1

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird dann filtriert von ausgefallenen Verunreinigungen und anschließend bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol aufgenommen, das ebenfalls im Vakuum verdampft wird. Danach wird der Rückstand in 250 ml kaltem Acetonitril gelöst.

9,4 g (0,03 Mol) Nicotinyltyrosinäthylester werden in 450 ml Acetonitril unter Erwärmen gelöst, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt und zu der Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen. Diese wird dann von Ausgefallenem abfiltriert. Das Filtrat wird dann bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft und

der sirupöse Rückstand in ca. 50 ml Chloroform gelöst. Die stark gekühlte Chloroformlösung wird dann in kalten Äther eingegossen, wobei das Umsetzungsprodukt ausfällt. Nach dem Absetzen des Produktes wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit Äther nachdekantiert. Da das Produkt in Essigester sich nicht löst, wird es nochmal in Chloroform gelöst und wie vorher mit Äther durch Eingießen gefällt. Das Produkt wird anschließend abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 8,6 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 97 - 101°C

C (gefunden)	54,68 %
H (gefunden)	5,36 %
N (gefunden)	5,33 %

Bezogen auf das Nicotinyltyrosinäthylester-N^1-hydrochlorid (81,98 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{17}H_{19}ClN_2O_4$

C (berechnet)	58,20 %
H (berechnet)	5,46 %
N (berechnet)	7,98 %

Molgewicht : 350,812

Gültige Vorschrift nach Ansatz 2:

15,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 500 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird danach von ausgefallenen Verunreinigungen abfiltriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird dann 3 mal mit je 30 ml Benzol gelöst, das dann abdestilliert wird. Anschließend wird der Sirup in 250 ml kaltem Acetonitril gelöst.

9,4 g (0,03 Mol) Nicotinyltyrosinäthylester werden in 450 ml Acetonitril durch Erwärmen gelöst und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Diese Lösung wird dann zu der kalten Zuckerlösung zugegeben und bleibt 14 Tage im Kühlschrank stehen. Sie wird dann von Ausgefallenem abfiltriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der sirupöse Rückstand wird dann in ca. 50 ml Chloroform gelöst. Diese Lö-

sung wird stark abgekühlt und in kalten Äther eingegossen. Es fällt ein sirupöser Niederschlag aus, nach dessen Absetzen das Lösungsmittelgemisch abdekantiert wird. Danach wird dieser nochmal in Chloroform gelöst, die Lösung stark gekühlt und wieder in kalten Äther eingegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 14,6 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 98 - 100°C

C (gefunden)	58,27 %
H (gefunden)	5,12 %
N (gefunden)	4,89 %

Bezogen auf das Nicotinyltyrosinäthylester-N^1-hydrochlorid

Bruttoformel: $C_{17}H_{19}ClN_2O_4$

C (berechnet)	58,20 %
H (berechnet)	5,46 %
N (berechnet)	7,98 %

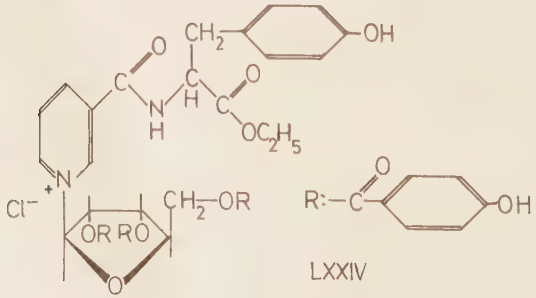
Molgewicht : 350,812

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltyrosinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel: $C_{43}H_{39}ClN_2O_{11} \cdot 1H_2O$

C (berechnet)	63,51 %
H (berechnet)	5,08 %
N (berechnet)	3,44 %

Molgewicht : 813,28



LXXIV

8.2.2.9. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylglycinäthylester zur Darstellung von N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (LXXV).

Die fluorierte Verbindung N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid wurde als Gegenstück zu der nichtfluorierten Verbindung N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid mit der Absicht dargestellt, zu ermitteln, ob diese eine stärkere toxische Wirkung auf Lebewesen ausübt als die einfachen benzoylierten Nucleosidvorstufen. Die Darstellung erfolgte analog der nichtfluorierten Verbindung.

Vorversuch: Ansatz 1

8,38 g (0,015 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 600 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Anschließend wird die Lösung nach dem Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird anschließend mit 30 ml Benzol behandelt, das gleichfalls abdestilliert wird. Anschließend wird dieser in 300 ml Acetonitril, der stark gekühlt ist, gelöst.

3,15 g (0,015 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst und zu der kalten obigen Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird dann von Ausgefallenem abfiltriert. Die Lösung wird dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt und der Rückstand in 40 ml Chloroform aufgenommen. Nach Abkühlen der Chloroformlösung wird diese in kalten Äther eingegossen. Es fällt ein Niederschlag aus. Nach Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und der Rückstand mit Essigester behandelt. Dabei bleibt der in Essigester unlösliche Teil als Fraktion I zurück. Die Essigesterlösung wird nach starken Abkühlen

ebenfalls in kalten Äther gegossen. Der Niederschlag ergibt die Fraktion II, die abgesaugt, mit kaltem Äther gewaschen und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Ansatz 1

Fraktion I (in Essigester unlöslicher Teil)

Ausbeute : 0,5 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 171 - 172°C

C	(gefunden)	49,98 %
H	(gefunden)	5,12 %
N	(gefunden)	10,59 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (13,6 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (in Essigester löslicher Teil)

Ausbeute : 2,0 g N^1-[2',3',5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (17,52 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 92 - 93°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{30}ClF_3N_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,14 %
	(berechnet)	56,81 %
H	(gefunden)	4,18 %
	(berechnet)	4,24 %
N	(gefunden)	4,16 %
	(berechnet)	3,68 %
F	(gefunden)	10,84 %
	(berechnet)	7,49 %

Molgewicht : 761,125

Gültige Vorschrift nach Ansatz 2

16,76 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose werden in 1200 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 7-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Danach wird die Lösung filtriert und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in ca. 30 ml Benzol gelöst, das dann ebenfalls eingedampft wird. Anschließend wird er in 600 ml kaltem Acetonitril gelöst und gekühlt.

6,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der kalten obigen Zuckerlösung zugegeben. Die Reaktionslösung bleibt 7 Tage im Kühlschrank stehen und wird nach dem Abfiltrieren von Verunreinigungen im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen und stark abgekühlt. Die kalte Lösung wird dann in kalten Äther eingegossen, wobei ein weißer Niederschlag ausfällt. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert und mit ca. 50 ml Essigester versetzt. Dabei löst sich der größte Teil auf. Der in Essigester unlösliche Teil bleibt als Fraktion I zurück. Die Essigesterlösung wird nach dem Abkühlen ebenfalls in kalten Äther eingegossen. Dabei fällt Fraktion II aus, die abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

Ansatz 2

Fraktion I (in Essigester unlöslicher Teil)

Ausbeute : 1,5 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt:	168 - 169°C	C (gefunden)	51,01 %
		H (gefunden)	5,01 %
		N (gefunden)	10,04 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (20,43 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (in Essigester löslicher Teil)

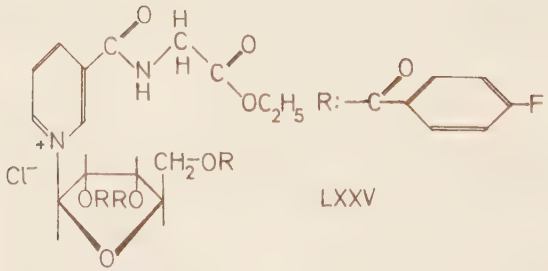
Ausbeute : 4,9 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (21,46 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 89 - 91 °C

Bruttoformel: $C_{36}H_{30}ClF_3N_2O_{10} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	57,21 %
	(berechnet)	56,81 %
H	(gefunden)	4,18 %
	(berechnet)	4,24 %
N	(gefunden)	4,04 %
	(berechnet)	3,68 %
F	(gefunden)	6,63 %
	(berechnet)	7,49 %

Molgewicht : 761,125



LXXV

8.2.2.10. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.4-6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose mit Nicotinylglycinäthylester zur Darstellung von N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (LXXVI)

Als Derivat mit veränderter Zuckerkomponente, Glucose statt

Ribose, wurde versucht, N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid aus 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose und Nicotinylglycinäthylester darzustellen. Es wurden in Vorversuchen Ansätze unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Ansatz 1 ergab nur eine Fraktion, die in Essigester lösliche, Ansatz 2 dagegen zwei Fraktionen.

Vorversuche

Vorschrift: Ansatz 1

19,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose werden in 1200 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 14-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst, wobei die Verbindung in die 1-Chlor-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose umgewandelt wird. Die Lösung wird nach dem Abfiltrieren von ausgefallenen Verunreinigungen bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft, der sirupöse Rückstand 3 mal mit je 30 ml Benzol gelöst, das abdestilliert wird, und anschließend in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst.

8,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst, in der Kälte zu der Glucoselösung zugegeben und mit 50 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank, wonach nach dem Abfiltrieren von Ausgefallenem diese im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft und der Rückstand in Chloroform aufgenommen wird. Es fällt kein Niederschlag aus. Die Lösung wird dann stark abgekühlt und mit kaltem Äther überschichtet und anschließend vermischt. Nach dem Absetzen des schmierigen Niederschlages wird die überstehende Lösung abdekantiert und der Rückstand mit Essigester behandelt, worin er sich voll löst. Die Essigesterlösung wird in der Kälte ebenfalls mit Äther behandelt. Der schmierige Niederschlag wird nach dem Absetzen abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ansatz 1

Ausbeute : 2,2 g N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (8,8 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 105 - 113°C

Bruttoformel: $C_{44}H_{39}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	63,00 %
	(berechnet)	62,82 %
H	(gefunden)	4,90 %
	(berechnet)	4,91 %
N	(gefunden)	3,80 %
	(berechnet)	3,33 %

Molgewicht : 841,29

Ansatz 2

Fraktion I (der in Essigester unlösliche Teil)

Ausbeute : 2,0 g Umsetzungsprodukt

Schmelzpunkt: 165 - 173°C

C	(gefunden)	49,20 %
H	(gefunden)	5,10 %
N	(gefunden)	10,90 %

Bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid (27,02 % d. Th.)

Bruttoformel: $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$

C	(berechnet)	49,09 %
H	(berechnet)	5,36 %
N	(berechnet)	11,45 %

Molgewicht : 244,687

Fraktion II (der in Essigester lösliche Teil)

Ausbeute : 4,0 g N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$ (16,06 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 93 - 103°C

Bruttoformel: $C_{44}H_{39}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	64,70 %
	(berechnet)	62,82 %
H	(gefunden)	4,90 %
	(berechnet)	4,91 %

Molgewicht : 841,29

Gültige Vorschrift nach Ansatz 3

19,2 g (0,03 Mol) 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose werden in 1200 ml mit HCl-Gas in der Kälte gesättigtem Äther durch 14-tägiges Stehen im Kühlschrank gelöst. Die Lösung wird dann nach dem Abfiltrieren von den ausgefallenen Verunreinigungen bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird 3 mal mit je 30 ml Benzol gelöst, das jedesmal abdestilliert wird, und anschließend in 500 ml kaltem Acetonitril gelöst.

6,3 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester werden in 50 ml Acetonitril gelöst, in der Kälte zu der Reaktionslösung gegeben und mit 50 ml Acetonitril nachgespült. Die Reaktionsmischung bleibt 7 Tage im Kühlschrank, wird dann von Ausgefallenem filtriert und danach im Vakuum bei Zimmertemperatur eingeengt. Der Rückstand wird dann in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen, worin er sich vollständig löst. Dann wird die Lösung stark abgekühlt und mit kaltem Äther überschichtet und vermischt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus. Nach dem Absetzen desselben wird das Lösungsmittelgemisch abdekantiert, mit etwas Äther nachdekantiert, und der Rückstand anschließend mit Essigester behandelt, in dem er sich vollständig löst. Diese Lösung wird gleichfalls abgekühlt und mit kaltem Äther wie oben behandelt. Es fällt ein schmieriger Niederschlag aus, der abgesaugt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet wird.

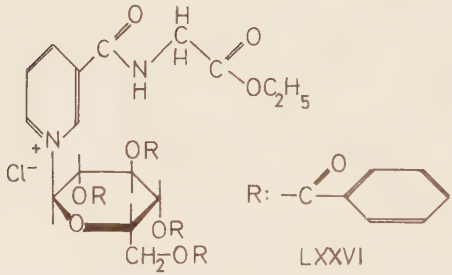
Ausbeute : 2,0 g N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid $\cdot$ $1H_2O$ (8,03 % d. Th.)

Schmelzpunkt: 105 - 115°C

Bruttoformel: $C_{44}H_{39}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	63,10 %
	(berechnet)	62,82 %
H	(gefunden)	5,10 %
	(berechnet)	4,91 %
N	(gefunden)	3,20 %
	(berechnet)	3,33 %

Molgewicht : 841,29



LXXVI

8.3. Zusammenfassende Besprechung der Versuchsbedingungen mit Tabellen

In diesem Kapitel werden die Versuchsbedingungen und die Tabellen der hergestellten Nicotinylaminosäureester und der benzoylierten Nucleosid-Derivate besprochen.

8.3.1. Über die Synthese der Nicotinylaminosäureester

Für die Synthese der Nicotinylaminosäureester werden die ursprünglichen Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Nicotinylglycinäthylesters durch Vorversuche geändert. Es bleiben die Molverhältnisse (je 0,05 Mol Nicotinylchlorid-hydrochlorid und Glycinäthylester-hydrochlorid) und das Lösungsmittel und die Lösungsmittelmengen. Dagegen tritt anstelle von Triäthylamin, das ursprünglich als Reaktionsmittel das Chlorid aufnimmt und bindet, das Pyridin. Auch wird die Synthese in einer Stufe durchgeführt, da die Stufe des Nicotinylglycinäthylester-hydrochlorids durch die Anwendung des Pyridins und durch sorgfältiges Waschen der Reaktionslösung mit Wasser wegfällt.

Die heraus hervorgehende gültige Vorschrift zur Synthese des Nicotinylglycinäthylesters dient auch als Modellvorschrift zur Darstellung der anderen, oben erwähnten Nicotinylaminosäureester. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3 wiedergegeben.

Zur Synthese der benzoylierten Nucleosid-Derivate werden die Reaktionsbedingungen nach folgenden Gesichtspunkten verändert:

1.) Das Molverhältnis der Reaktionspartner Nicotinylaminosäureester und benzoyliertes Kohlenhydrat wird verändert;
2.) die Lösungsmittelmengen, in der die Reaktionspartner vor dem Zusammengeben gelöst werden;
3.) die Reaktionsdauer und
4.) die Reihenfolge des Zugebens des einen zum anderen Reaktionspartner.

Tabelle 3: Darstellung der Nicotinylaminosäureäthylester

As.	Brutto-formel	Nicotinyl-chlorid · HCl		Aminosäu-reester		Ausbeute		Schmp.	Analyse					
									C		H		N	
		g	Mol	g	Mol	g	%	°C	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
1.	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	8,9	0,05	7,1	0,05	5,7	54,7	53-55	57,6	57,68	5,9	5,89	13,3	13,45
2.	$C_{11}H_{14}B_2O_3$	8,9	0,05	7,8	0,05	4,5	40,5	48-50	58,7	59,45	6,3	6,35	12,7	12,59
3.	$C_{13}H_{18}N_2O_3S$	8,9	0,05	11,4	0,05	3,5	24,0	57-60	54,0	53,58	6,7	6,57	9,8	9,61
4.	$C_{15}H_{20}N_2O_5$	8,9	0,05	12,0	0,05	12,0	73,5	Oel	54,0	55,20	6,3	6,79	8,3	8,58
5.	$C_{19}H_{19}N_3O_3$	8,9	0,05	13,7	0,05	11,5	68,1	123-124	67,8	67,64	5,9	5,67	11,6	12,46
6.	$C_{20}H_{24}N_4O_4$	8,9	0,05	6,2	0,025	4,2	43,8	57-60	62,2	62,50	6,6	6,29	13,8	14,58
7.	$C_{18}H_{20}N_2O_3S$	8,9	0,05	13,8	0,05	13,0	75,2	118-119	62,2	62,76	6,2	5,85	7,4	8,13
8.	$C_{17}H_{18}N_2O_4$	8,9	0,05	12,3	0,05	11,5	73,5	143-144	63,7	64,95	5,7	5,77	8,6	8,91

As. = Aminosäure: 1. Glycin; 2. DL-Alanin; 3. DL-Methionin; 4. L-(+)-Glutaminsäure; 5. DL-Tryptophan; 6. DL-Lysin; 7. S-Benzyl-L-cystein; 8. L-Tyrosin

8.3.2. Über die Synthese der benzoylierten Nucleosid-Derivate

8.3.2.1. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylglycinäthylester.

Zur Erprobung der Darstellung des benzoylierten Nucleosids N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-glycinäthylester-N^1-chlorid wurden in Vorversuchen die Reaktionsbedingungen untersucht:

1.) das Molverhältnis der Reaktionspartner 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose und Nicotinylglycinäthylester;
2.) die Menge der Lösungsmittel, in der diese Reaktionskomponenten gelöst sind;
3.) die Reaktionsdauer in Tagen bei Kühlschranktemperaturen von ca. 5°C und
4.) die Reihenfolge der Zugabe des einen Reaktionspartners zum anderen.

Das Ziel dieser Variierungen ist die größte Ausbeute an Umsetzungsprodukt und das beste Analysenergebnis.

Auswertung der Versuche:

Die meisten der Versuchsansätze 3 - 13, die als Vorversuche in der Tabelle 19 beschrieben werden, sind dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Kupplungskomponenten, 0,03 Mol 2.3.5-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosylchlorid bzw. 1-Chlor-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose (aus 15,2 g; 0,03 Mol 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose) und 6,2 g (0,03 Mol) Nicotinylglycinäthylester in 50 - 150 ml Acetonitril bzw. 500 - 600 ml Acetonitril gelöst und die Zuckerlösung zur Nicotinylglycinäthylester-Lösung (Esterkomponente) gegeben wurde. Die Reaktionsdauer im Kühlschrank betrug 7 Tage. Für den Ansatz 12 wurde die Zuckerkomponente in 500 ml Acetonitril gelöst und die Esterkomponente, gelöst in 200 ml Acetonitril, zur oberen zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 7 Tage. Für den Ansatz 7 wurde eine ver-

Tabelle 19: Umsetzungsprodukt des Nicotinylglycinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose
Analysenwerte bezogen auf Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$,
Molgewicht: 244,687; C (berechnet) 49,09 %; H ber. 5,36 %; N ber. 11,45 %; Cl ber.14,45%

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyltribenzoylribofuranose g	Acetyltribenzoylribofuranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylglycinäthylester g	Nicotinylglycinäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.	Analyse Cl gef.
3	I	15,2	0,03	50	6,2	0,03	500	12	1,7	23,33	165-170	49,3	5,5	11,2	-
4	I	15,2	0,03	150	6,2	0,03	600	7	1,2	16,47	170-175	48,8	5,2	10,5	-
6	I	15,2	0,03	50	6,2	0,03	500	7	1,2	16,47	169-175	50,9	5,5	-	14,0
7	I	15,2	0,03	50	12,4	0,06	500	7	1,7	11,67	164-170	49,0	5,6	-	-
12	I	15,2	0,03	500	6,2	0,03	200	7	2,2	15,10	180-183	50,0	5,4	12,1	-
13	I	15,2	0,03	100	6,2	0,03	600	7	2,7	37,06	178-183	-	-	-	-

doppelte Menge Nicotinylglycinäthylester (12,4 g; 0,06 Mol) bei einer Reaktionsdauer von 7 Tagen verwendet. Dagegen betrug bei gleichen Mengenverhältnissen der Komponenten (1 : 1) beim Ansatz 3 die Reaktionsdauer 12 Tage.

Trotz der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ergaben die ersten Vorversuchsansätze in Hinblick auf das obige gewünschte Produkt keine guten Analysenergebnisse, sondern diese Ergebnisse stimmen mit den für das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid berechneten überein.

Die Ansätze 15 bis 25 der Vorversuche, beschrieben in den Tabellen 20 und 21, ergaben durch Ergänzung der Vorschriften eine zweite, manchmal eine dritte Fraktion, die durch vollständige Ausfällung und Auskristallisation des in Essigester gelösten Teils der Reaktionsprodukte erhalten wird.

Die Ansätze 15 und 16 wurden nach der Methode dargestellt, daß die Zuckerkomponente (0,03 Mol), gelöst in 100 ml Acetonitril, zur Esterkomponente (0,03 Mol), gelöst in 600 ml Acetonitril, gegeben wurde. Die Reaktionszeit betrug 7 Tage und die Molverhältnisse der beiden Komponenten 1 : 1. Die Analysenwerte der Fraktionen I der Ansätze 15 und 16, welche in Essigester unlöslich sind, ähneln den für das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid berechneten, die der Fraktionen II, die das in Essigester lösliche Produkt enthält, den für das benzoylierte Nucleosid N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid.

Die Ansätze 19 bis 22 gaben je drei Fraktionen:

Fraktion I, der aus der Chloroformlösung ausgefallene Teil,
Fraktion II, der in Essigester unlösliche Teil und
Fraktion III, der in Essigester lösliche Teil.

Die Reaktionsbedingungen dieser vier Ansätze (19 bis 22) wurden wie folgt variiert: Die Menge der Zuckerkomponente (15,2 g; 0,03 Mol) blieb gleich. Variiert wurde die Estermenge: 0,01 Mol bzw. 0,015 Mol, und die Reaktionsdauer:

7 bzw. 2 Tage, Reaktionszeit bei Kühlschranktemperaturen, und die Lösungsmittelmengen, in denen beide Komponenten gelöst wurden. Die Esterkomponente wurde bei diesen vier Vorversuchsansätzen in nur je 50 ml Acetonitril gelöst und zur Zuckerkomponente, gelöst in 500 ml Acetonitril, hinzugegeben.

Dadurch sollten die Reaktionsmöglichkeiten der chlorierten Zuckermoleküle verbessert werden, da diese sofort mit den reaktionsträgeren Nicotinylglycinäthylester-Molekülen reagieren konnten, welche jetzt in einem kleinen Volumen in größerer Konzentration zugegeben werden konnten. Im umgekehrten Fall (siehe Ansätze 3 bis 16) war die Estermenge in starker Verdünnung in dem großen Acetonitrilvolumen vorhanden, wodurch die Reaktionsmöglichkeiten der Zuckermoleküle durch Vergrößerung der Teilchenweglänge vermindert wurde.

Bei den Ansätzen 19, 21 und 22 wurden gleichzeitig die Estermengen herabgesetzt: 2,1 g; 0,01 Mol, Molverhältnis 3 : 1, bei Ansatz 20 Molverhältnis 2 : 1. Das wurde mit der Absicht durchgeführt, die Reaktionsmöglichkeiten des einzelnen Ester-Moleküls in der Lösung auf Grund des Überschusses an Ribose-Molekülen zu verbessern und somit die Ausbeute der letzten Fraktion der Ansätze zu erhöhen. Das wurde nicht erreicht, sondern die Ausbeuten der Fraktionen III verringerten sich. Die Analysenergebnisse der Fraktionen I und II der Ansätze 19 bis 22 zeigen keine Übereinstimmung mit den berechneten Werten für die benzoylierten Nucleoside, sondern mit denen von Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochloriden. Erst die Fraktion III gab annähernd übereinstimmende Werte mit den für die benzoylierten Nucleoside berechneten.

Die Ansätze 23 und 25 (Tabelle 21) gaben wiederum nur zwei Fraktionen: I, die in Essigester unlösliche und II, die in Essigester lösliche. Für die Ansätze 23 und 25 beträgt das Mol-Verhältnis wieder 1 : 1: 0,03 Mol der Zuckerkomponente und 6,2 g; 0,03 Mol der Esterkomponente. Die Esterkomponente wurde in 100 ml und die Zuckerkomponente in 500 ml Acetonitril gelöst und die Esterlösung zur Zuk-

kerlösung in der Kälte hinzugegeben. Die Reaktionslösung blieb beim Ansatz 23 sieben, beim Ansatz 25 zwei Tage im Kühlschrank stehen. Die Analysenergebnisse der Fraktionen I entsprechen annähernd den des Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorids. Das Gleiche trifft auch für die Ausbeuten der I-Fraktionen der einzelnen Ansätze der Vorversuche zu (siehe Tabelle 20), die denen des Hydrochlorids stark ähneln. Die Fraktionen II der Ansätze 23 und 25 ergaben gute Analysenergebnisse, die denen des benzoylierten Nucleosids gleichen (Tabelle 21).

Für die endgültige Vorschrift zur Darstellung des benzoylierten Nucleosids werden die Vorschriften der Ansätze 30 und 40 herangezogen. Die Ansätze wurden im Komponentenverhältnis 1 : 1 (0,03 Mol Ester- und 0,03 Mol Zuckerkomponente) durchgeführt, die Reaktionsdauer betrug 7 Tage bei ca. 5°C im Kühlschrank und die Esterkomponente, gelöst in 100 ml Acetonitril, wurde zur Zuckerkomponente, gelöst in 600 ml Acetonitril, in der Kälte zugegeben. Die Ausbeuten an benzoyliertem Nucleosid betrugen 23,4 % bzw. 17,8 %, die Analysenwerte stimmen gut mit den berechneten überein.

Die Gesamtübersicht über die Versuche ergibt in Hinblick auf die vier veränderlichen Reaktionsbedingungen, daß die Analysenergebnisse der Fraktionen I, die die in Essigester unlöslichen Produkte enthalten, sämtlich mit Ausnahme der Ansätze 30 und 40 mit denen des Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorids gut oder annähernd übereinstimmen, ohne daß die veränderlichen Reaktionsbedingungen einen großen Einfluß auf diese Werte, auf die Ausbeuten und teilweise auch auf die Schmelzpunkte ausüben (Tabellen 19 und 20). Dagegen zeigen die Fraktionen III der Ansätze 19, 21 und 22, in denen das Komponenten-Molverhältnis 3 : 1 (bei Ansatz 20; 2 : 1) beträgt, bei den Ansätzen 20 und 21 eine deutlich verminderte Ausbeute und auch schlechtere Analysenwerte (Tabelle 21).

Die Ansätze 30 und 40, von denen nur eine Fraktion gewonnen wurde, ergaben gute Ausbeuten und Analysenwerte.

Tabelle 20: Umsetzungsprodukt des Nicotinylglycinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose
Analysenwerte bezogen auf Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$,
Molgewicht: 244,687; C ber. 49,09 %; H ber. 5,36 %; N ber. 11,45 %; Cl ber. 14,45 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyltribenzoyl-ribofuranose g	Acetyltribenzoyl-ribofuranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylglycinäthylester g	Nicotinylglycinäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.
15	I	15,2	0,03	100	6,2	0,03	600	7	2,2	30,19	180-182	50,2	5,5	12,4
16	I	15,2	0,03	100	6,2	0,03	600	7	0,8	10,98	170-174	49,5	5,5	11,3
19	I	15,2	0,03	600	2,1	0,01	50	7	0,7	28,36	180-184	49,7	5,4	11,3
	II								0,5	20,26	183-187	50,0	5,2	13,6
20	I	15,2	0,03	500	3,1	0,015	50	7	1,0	27,45	178-183	50,1	5,4	10,1
	II								0,5	13,72	172-178	50,3	5,2	13,1
21	I	15,2	0,03	500	2,1	0,01	50	7	0,8	32,41	168-171	49,5	5,4	11,1
	II								1,2	48,62	148-150	-	-	8,2
22	I	15,2	0,03	500	2,1	0,01	50	2	0,8	32,41	170-173	49,4	5,4	-
	II								0,7	28,37	168-173	49,1	5,3	10,9
23	I	15,2	0,03	500	6,2	0,03	100	7	1,4	19,21	165-175	49,8	5,4	-
25	I	15,2	0,03	500	6,2	0,03	100	2	0,8	10,98	163-167	50,2	5,4	10,3

Tabelle 21: Umsetzungsprodukt: N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chorid · $1H_2O$; $C_{36}H_{33}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 707,149; C ber. 61,15 %; H ber. 4,99 %; N ber. 3,96 %; Cl ber. 5,01 %

Ansatz	Fraktion	Acetylbenzoylribofuranose		Acetonitril	Nicotinylglycinäthylester		Acetonitril	Rk.-Zeit	Ausbeute		Schmp.	Analyse		
Nr.		g	Mol	ml	g	Mol	ml	Tage	g	%	°C	C gef.	H gef.	N gef.
15	II	15,2	0,03	100	6,2	0,03	600	7	4,7	22,32	78-85	60,8	4,9	4,8
16	II	15,2	0,03	100	6,2	0,03	600	7	1,1	5,22	70-75	60,2	5,1	4,5
19	III	15,2	0,03	600	2,1	0,01	50	7	1,5	21,03	94-95	60,8	5,0	4,1
20	III	15,2	0,03	500	3,1	0,015	50	7	0,8	7,60	82-84	59,8	5,1	4,4
21	III	15,2	0,03	500	2,1	0,01	50	7	0,5	7,01	65-70	57,8	5,4	-
22	III	15,2	0,03	500	2,1	0,01	50	2	1,4	19,63	93-95	60,8	4,9	4,2
23	II	15,2	0,03	500	6,2	0,03	100	7	5,4	25,65	90-95	61,1	5,2	4,3
25	II	15,2	0,03	500	6,2	0,03	100	2	12,4	58,89	80-85	61,0	5,2	4,3
30	I	15,2	0,03	600	6,3	0,03	100	7	5,0	23,37	90-95	61,4	5,7	4,1
40	I	15,2	0,03	600	6,3	0,03	100	7	3,8	17,76	84-89	61,2	5,0	4,1

8.3.2.2. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylalaninäthylester.

Es wurden für die Versuche der Darstellung des benzoylierten Nucleosids N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid aus der Zuckerkomponente 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose und der Esterkomponente Nicotinylalaninäthylester in mehreren Vorversuchen, in denen die vier Versuchsbedingungen:

1.) Molverhältnis der Reaktionskomponenten,
2.) Mengen der Lösungsmittel,
3.) Reihenfolge der Zugabe der Reaktionslösungen und
4.) Reaktionsdauer

variiert wurden, in Hinblick auf Ausbeute, Analysenwerte und Schmelzpunkt die Reaktionsbedingungen wie bei den Glycin-Derivaten untersucht.

Bei den Ansätzen 3, 4 und 6, beschrieben in Tabelle 22, wurde die Zuckerkomponente (15,2 g; 0,03 Mol) in 100 ml Acetonitril gelöst und zur Esterkomponente (6,7 g; 0,03 Mol), die in 600 ml Acetonitril gelöst war, gegeben. Die Reaktionszeit betrug 7 Tage, und es wurde die Zuckerkomponenten-Lösung zur Esterkomponenten-Lösung zugegeben. Die Ausbeuten sind zwar gut, aber die Analysenwerte der Ansätze 3 und 4 nähern sich denen des Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorids, dagegen die des Ansatzes 6 denen des benzoylierten Nucleosids.

Die Ansätze der Vorversuche 7 bis 15 wurden analog des Glycin-Derivats unter veränderten Reaktionsbedingungen dargestellt: Die Zuckerkomponente wurde in 500 ml Acetonitril gelöst und zu der Esterkomponenten-Lösung (Ester gelöst in 50 bis 100 ml Acetonitril) in der Kälte gegeben. Ferner wurden verändert: 0,03 Mol auf 0,01 Mol der Esterkomponente zur konstanten Menge der Zuckerkomponente (0,03 Mol); Molverhältnis 3 : 1) und Veränderung der Reaktionszeit: 7 Tage bzw. 2 Tage.

Die Versuchsansätze ergaben für diese Derivate nur eine Fraktion, Fraktion I, die in Essigester lösliche. Für die

Tabelle 22: Umsetzungsprodukt des Nicotinylalaninäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Nicotinylalaninäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{11}H_{15}ClN_2O_3$; Molgewicht: 258,714; C ber. 51,07 %; H ber. 5,85 %; N ber. 10,83 %; Cl ber. 13,71 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyltribenzoylribofuranose g	Acetyltribenzoylribofuranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylalaninäthylester g	Nicotinylalaninäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.
3	I	15,2	0,03	100	6,7	0,03	600	7	2,7	34,6	56-60	56,2	5,4	10,2
4	I	15,2	0,03	100	6,7	0,03	600	7	4,1	52,6	80-85	52,4	6,1	10,2
	Analysenwerte bezogen auf N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylalaninäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$, $C_{37}H_{35}ClN_2O_{10} \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 721,176; C ber. 61,62 %; H ber. 5,17 %; N ber. 3,88 %; Cl ber. 4,92 %													
6	I	15,2	0,03	100	6,7	0,03	600	7	11,5	52,9	60-70	59,8	5,4	-
7	I	15,2	0,03	500	6,7	0,03	50	7	11,8	54,3	65-68	-	-	6,3
8	I	10,1	0,02	350	2,2	0,01	50	7	2,7	37,8	60-65	-	-	6,2
9	I	15,2	0,03	500	2,2	0,01	50	7	2,9	40,6	40-42	57,8	5,9	6,1
15	I	15,2	0,03	600	6,7	0,03	100	2	11,1	51,1	72-76	57,4	5,5	-

Ansätze 8 und 9 betrug das Molverhältnis beider Komponenten 2 bzw. 3 : 1 (10,1 g bzw. 15,2 g; 0,02 Mol bzw. 0,03 Mol Zuckerkomponente zu 2,2 g; 0,01 Mol Esterkomponente) und für den Versuch 15, der als endgültiger Versuchsansatz angeführt wird, bei einem Molverhältnis von 1 : 1 eine Reaktionsdauer von 2 Tagen bei ca. 5°C.

Die Ausbeuten sind durch die variierten Reaktionsbedingungen nicht beeinflußbar, und die Analysenergebnisse sind nur angenähert an die berechneten des benzoylierten Nucleosid-Derivats.

8.3.2.3. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylmethioninäthylester.

Es wurde versucht, das benzoylierte Nucleosid N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid darzustellen, indem die vier veränderbaren Reaktionsbedingungen, die schon in den vorherigen Darstellungen der Analoge beschrieben wurden, variiert werden. Die ersten Versuchsansätze sind als Vorversuche mit variierten Reaktionsbedingungen zu betrachten, um eine gute Ausbeute und gute Analysenergebnisse zu erhalten. Die Werte werden in der Tabelle 23 wiedergegeben.

Es werden von den Ansätzen 1 bis 5 je zwei Fraktionen erhalten: I, die in Essigester unlösliche und II, die in Essigester lösliche. Für den Ansatz 1 der Vorversuche wurde die Zuckerkomponente (0,03 Mol) in 100 ml Acetonitril gelöst und zur Esterkomponente (8,4 g; 0,03 Mol) gegeben. Es wurden die Fraktionen I und II erhalten. Die Analysenergebnisse beider Fraktionen zeigen eine Übereinstimmung mit den Werten für das Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid.

Für die Ansätze 5 bis 13 wurde die Zuckerkomponente (0,03 Mol) in 500 ml Acetonitril gelöst und die Esterkomponente in 50 ml, die dann zur ersteren zugegeben wurde. Die Estermenge betrug bei den Ansätzen 11 und 13 2,8 g (0,01 Mol), die Reaktionsdauer bei den Ansätzen 12 und 13 zwei Tage.

Tabelle 23: Umsetzungsprodukt des Nicotinylmethioninäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{13}H_{19}ClN_2O_3S$; Molgewicht: 318,834; C ber. 48,98%; H ber. 6,01 %; N ber. 8,78 %; Cl ber. 11,12 %; S ber. 10,06 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyl-tribenzoyl-ribofuranose g	Acetyl-tribenzoyl-ribofuranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylmethioninäthylester g	Nicotinylmethioninäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.
1	I	15,2	0,03	100	8,4	0,03	600	7	2,8	29,52	105-108	49,4	5,8	6,3
	II								1,0	10,54	111-114	49,3	6,0	13,8
5	I	15,2	0,03	500	8,4	0,03	50	7	3,4	35,85	116-118	48,8	6,4	8,5
13	I	15,2	0,03	500	2,8	0,01	100	2	3,1	98,05	-	53,0	5,8	6,3
		Analysenwerte bezogen auf N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylmethioninäthylester-N^1-chlorid · $2H_2O$, $C_{39}H_{39}ClN_2O_{10}S \cdot 2H_2O$; Molgewicht: 799,312; C ber. 58,60%; H ber. 5,42 %; N ber. 3,50 %; Cl ber. 4,44 %												
5	II	15,2	0,03	500	8,4	0,03	50	7	4,3	17,93	-	55,0	5,9	5,5
6	I	15,2	0,03	500	4,2	0,015	50	7	3,0	25,23	-	54,6	5,6	-
11	I	15,2	0,03	500	2,8	0,01	100	7	2,2	27,76	-	55,6	5,8	5,4
12	I	15,2	0,03	500	8,4	0,03	100	2	8,1	23,78	-	57,3	5,7	4,5
13	I	15,2	0,03	500	2,8	0,01	100	2	3,1	39,11	-	53,0	5,8	6,3

Bei den übrigen Ansätzen betrug die Estermenge 8,4 g (0,03 Mol) und die Reaktionsdauer 7 Tage. Ansatz 5 gab zwei Fraktionen wie Ansatz 1, die Ansätze 6 bis 13 nur eine Fraktion (Fraktion I der Tabelle 23). Die Analysenergebnisse des Ansatzes 5, Fraktion I, ähneln denen des Nicotinylmethioninäthylester-N^1-hydrochlorids, dagegen die des Ansatzes 5, Fraktion II, und die der Ansätze 6 bis 13 den benzoylierten Nucleosiden. Auf Grund des guten Analysenergebnisses wurde die Vorschrift für den Ansatz 12 als gültige Vorschrift verwendet.

Bei den Ansätzen 6, 11 und 13 veringerten sich die Ausbeuten, da die Molverhältnisse der Reaktionskomponenten 3 : 1 betrugen. Die Reaktionsdauer hatte keinen Einfluß, dafür zeigte die Reihenfolge der Zugabe der einen Komponente zur anderen eine Verbesserung der Analysenwerte, wie es aus dem Vorversuch ersichtlich wurde.

8.3.2.4. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester.

In mehreren Versuchsansätzen, zu denen auch die Vorversuche zählten, wurde versucht, das benzoylierte Nucleosid N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid aus den Komponenten 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose und Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester darzustellen. Dabei wurden beide Komponenten im Molverhältnis 1 : 1 (Esterkomponente 11,5 g; 0,03 Mol und Zuckerkomponente 15,2 g; 0,03 Mol) zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsbedingungen wurden nicht variiert: Reaktionsdauer 7 Tage und Zugabe der Esterkomponente, 11,5 g gelöst in 300 ml Acetonitril, zur Lösung der Zuckerkomponente, 15,2 g gelöst in 300 ml Acetonitril.

Die Analysenwerte entsprechen den Werten des Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-hydrochlorids (Tabelle 24).

8.3.2.5. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylglutaminsäure-diäthylester.

Tabelle 24: Umsetzungsprodukt des Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{18}H_{21}ClN_2O_3S$; Molgewicht: 380,905; C ber. 56,76 %; H ber. 5,55 %; N ber. 7,35 %; S ber. 8,42 %; Cl ber. 9,31 %

und bezogen auf N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl-S-benzyl-L-cysteinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$, $C_{44}H_{41}ClN_2O_{10}S \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 843,37 ; C ber. 62,67 %; H ber. 5,14 %; N ber. 3,32 %; S ber. 3,80 %; Cl ber. 4,21 %

Ansatz	Fraktion	Acetyl-tribenzoyl-ribofuranose		Acetonitril	Nicotinyl-S-benzyl-L-cyst. ester		Acetonitril	Rk.-Zeit	Ausbeute		Schmp.	Analyse			
Nr.		g	Mol	ml	g	Mol	ml	Tage	g	%	°C	C gef.	H gef.	N gef.	S gef.
1	I	15,2	0,03	300	11,5	0,03	300	7	6,8	53,50	-	56,5	5,8	5,3	6,3
2	I	15,2	0,03	300	11,5	0,03	300	7	6,4	50,35	-	56,8	5,8	5,4	6,4
3	I	15,2	0,03	300	11,5	0,03	300	14	3,8	15,35 +	46-47	57,9	5,1	5,2	5,0
4	I	15,2	0,03	300	11,5	0,03	300	14	9,4	37,96 +	56-58	59,1	5,5	4,9	5,5

+ = bezogen auf $C_{44}H_{41}ClN_2O_{10}S \cdot 1H_2O$

Für die Darstellungsversuche der Verbindung N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäure-diäthylester-N^1-chlorid wurden wie bei den vorhergehenden Derivaten mehrere Vorversuche durchgeführt.

Im Ansatz 3 wurde die Zuckerkomponente (15,2 g; 0,03 Mol) in 100 ml Acetonitril gelöst und zu der Esterkomponente, 9,3 g (0,03 Mol) gelöst in 500 ml Acetonitril, zugegeben. Die Analysenergebnisse beider Fraktionen I und II ähneln denen für das Nicotinylglutaminsäure-diäthylester-N^1-hydrochlorids berechneten.

Für die Ansätze 6 bis 9 wurden die Reaktionsbedingungen variiert: Die Zuckerkomponente wurde jedesmal in 500 ml Acetonitril gelöst. Im Ansatz 7 wurde die Esterkomponente auf 3,1 g (0,01 Mol) herabgesetzt und die Reaktionsdauer des Ansatzes 9 auf 2 Tage festgelegt. Die Analysenergebnisse dieser Vorversuche, die nur eine Fraktion, die in Essigester lösliche, ergaben, zeigten für das Nucleosid annähernde Werte. Die Ausbeute des Versuchs 9, dessen Vorschrift als endgültige Vorschrift verwendet wurde, ergab einen höheren Wert als die der anderen, was aus der Tabelle 25 zu erkennen ist.

3.3.2.6. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinyltryptophanäthylester.

Bei den Vorversuchen zur Darstellung des benzoylierten Nucleosids N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid ergab der Ansatz 2 drei Fraktionen: I, der aus Chloroform ausgefallene Teil, II, der in Essigester unlösliche Teil und III, der in Essigester lösliche Teil. Zur Reaktion wurden die Zucker- und die Esterkomponente im Molverhältnis 1 : 1 in 50 ml bzw. 300 ml Acetonitril gelöst und die Zucker- zur Esterkomponente zugegeben. Die Analysenergebnisse entsprachen denen des Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorids. Ein Unterschied der Analysenwerte der Fraktionen ist nicht erkennbar.

Tabelle 25: Umsetzungsprodukt des Nicotinylglutaminsäurediäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{15}H_{21}ClN_2O_5$; Molgewicht: 344,806; C ber. 52,25 %; H ber. 6,14 %; N ber. 8,12 %; Cl ber. 10,28 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyl-tribenzoyl-ribofuranose g	Acetyl-tribenzoyl-ribofuranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylglutaminsäureester g	Nicotinylglutaminsäureester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.
3	I	15,2	0,03	100	9,3	0,03	500	7	1,5	14,42	78-80	52,2	6,7	8,1
	II								7,1	68,27	45-50	54,6	5,9	6,3
		Analysenwerte bezogen auf N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$, $C_{41}H_{41}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 807,268; C ber. 61,0 %; H ber. 5,37 %; N ber. 3,47 %; Cl ber. 4,34 %												
6	I	15,2	0,03	500	9,3	0,03	100	7	3,4	13,96	-	59,9	5,7	4,6
7	I	15,2	0,03	500	3,1	0,01	100	7	2,7	33,27	-	57,3	5,8	4,8
9	I	15,2	0,03	500	9,3	0,03	100	2	13,4	55,03	-	59,4	5,5	3,8

Tabelle 26 a: Umsetzungsprodukt des Nicotinyltryptophanäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Nicotinyltryptophanäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{19}H_{20}ClN_3O_3$; Molgewicht: 373,850; C ber. 61,04 %; H ber. 5,39 %; N ber. 11,24 %; Cl ber. 9,48 %

Ansatz	Fraktion	Acetyltribenzoylribofuranose		Acetonitril	Nicotinyltryptophanäthylester		Acetonitril	Rk.-Zeit	Ausbeute		Schmp.	Analyse		
Nr.		g	Mol	ml	g	Mol	ml	Tage	g	%	°C	C gef.	H gef.	N gef.
	I								5,3	47,36	196-198	60,9	5,5	11,0
2	II	15,2	0,03	50	10,1	0,03	600	7	1,2	10,72	192-198	60,9	5,3	11,8
	III								3,6	32,17	104-108	60,4	5,2	7,4
5	I	15,2	0,03	250	10,2	0,03	250	7	13,7	-	125-128	61,6	5,0	-
6	I	15,2	0,03	250	3,4	0,01	250	7	2,8	74,32	102-108	60,5	6,0	-
	II								0,3	7,96	100-108	60,1	5,4	6,7
7	I	15,2	0,03	250	10,2	0,03	250	2	2,8	24,77	132-134	60,0	5,1	-
	II								11,0	97,33	125-128	61,6	5,2	-
8	I	15,2	0,03	250	3,4	0,01	250	2	1,7	45,12	132-135	54,6	5,0	-
	II								2,1	55,74	105-118	60,3	5,5	7,5

Tabelle 26 b: Umsetzungsprodukt des Nicotinyltryptophanäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$, $C_{45}H_{40}ClN_3O_{10} \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 836,312; C ber. 64,63 %; H ber. 5,06 %; N ber. 5,02 %; Cl ber. 4,24 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyltribenzoylribofuranose g	Acetyltribenzoylribofuranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinyltryptophanäthylester g	Nicotinyltryptophanäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.
5	II	15,2	0,03	250	10,2	0,03	250	7	0,3	1,18	105-120	64,4	5,5	6,3
7	III	15,2	0,03	250	10,2	0,03	250	2	0,9	3,56	120-122	63,6	5,0	-

Für die Ansätze 5 bis 8 wurden die vier variierbaren Bedingungen verändert: Ansatz 7 und 8 hatten eine Reaktionsdauer von 2 Tagen, die übrigen von 7 Tagen; die Ansätze 6 und 8 wurden mit einem Komponentenverhältnis von 3 : 1 (Esterkomponente nur 0,01 Mol) durchgeführt. Beide Komponenten wurden in je 250 ml Acetonitril gelöst. Das Analysenergebnis zeigt, daß nur die Ansätze 5, Fraktion II, und 7, Fraktion III, beide mit dem Komponentenverhältnis 1 : 1, ein Produkt mit einem dem benzoylierten Nucleosid ähnlichen Analysenergebnis hervorbrachten.

Die Ausbeuten dieser Ansätze sind nur gering und in der Tabelle 25b enthalten. Als gültige Vorschrift wurde die Vorschrift des besten Ansatzes, des Ansatzes 5 verwendet (Tabelle 26).

8.3.2.7. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Di-[nicotinyl]-lysinäthylester.

Für die Darstellungsversuche des benzoylierten Nucleosids Di-{N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyl}-lysinäthylester-N^1-chlorid wurden in Vorversuchsansätzen die Reaktionsbedingungen nur in Bezug auf die Reaktionsdauer variiert: Versuchsansatz 1 sieben Tage, Versuchsansätze 3 und 4 je zwei Tage. Die anderen Bedingungen wurden, da sie bei der Darstellung der anderen Derivate nur einen geringen Einfluß auf die Ausbeute ausüben, nicht verändert. Die Zuckerkomponente (15,2 g; 0,03 Mol) wurde bei allen Ansätzen in 500 ml Acetonitril gelöst, die Esterkomponente, 5,8 g (0,015 Mol) in je 100 ml Acetonitril. Es wurde das Komponenten-Molverhältnis 2 : 1 gewählt, da 1 Mol Di-[nicotinyl]-lysinäthylester 2 Mole der Zuckerkomponente kuppeln bzw. entsprechen. Es gibt nur eine Fraktion (Fraktion I). Das Ergebnis der Analysen läßt mehr auf die Bildung eines Di-[nicotinyl]-lysinäthylester-di-N^1-hydrochlorids schließen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Umsetzungsprodukt des Di-[nicotinyl]-lysinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Di-[nicotinyl]-lysinäthylester-di-N^1-hydrochlorid, $C_{20}H_{26}Cl_2N_4O_4$; Molgewicht: 457,374; C ber. 52,52 %; H ber. 5,73 %; N ber. 12,25 %; Cl ber. 15,50 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyl-tribenzoyl-ribofuranose g	Mol	Acetonitril ml	Dinicotinyl-lysinäthylester g	Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	%	Schmp. °C	Analyse C gef.	H gef.	N gef.
1	I	15,2	0,03	500	5,8	0,015	100	7	8,7	-	95-104	59,9	5,5	5,8
3	I	15,2	0,03	500	5,8	0,015	100	2	9,0	-	95-102	59,1	5,0	5,7
4	I	15,2	0,03	500	1,9	0,005	100	2	1,6	70,05	60-62	53,1	5,6	10,5

8.3.2.8. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinyltyrosinäthylester.

Für die Darstellungsversuche des benzoylierten Nucleosids N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinyltyrosinäthylester-N^1-chlorids wurden in Vorversuchsansätzen die Reaktionsbedingungen bezüglich der Reaktionsdauer variiert: Ansatz 1 sieben Tage und Ansatz 2 vierzehn Tage Reaktionszeit. Die übrigen Reaktionsbedingungen blieben gleich: Das Molverhältnis der Reaktionspartner betrug 1 : 1 (15,2 g; 0,C3 Mol der Zuckerkomponente und 9,4 g; 0,03 Mol der Esterkomponente). Auch wurde die Esterkomponente, die in 450 ml Acetonitril in der Wärme gelöst wurde und dann anschließend abgekühlt wurde, zu der Zuckerkomponente, gelöst in 250 ml Acetonitril, in der Kälte hinzugegeben. Es gibt nur eine Fraktion (Fraktion I). Die Analysenergebnisse stimmen annähernd mit denen des Nicotinyltyrosinäthylester-N^1-hydrochlorids überein. Eine Bildung des benzoylierten Nucleosid-Analogen fand nicht statt. Die Werte sind in Tabelle 28 aufgenzeichnet.

8.3.2.9. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose mit Nicotinylglycinäthylester.

Für die Darstellungsversuche des benzoylierten Nucleosids N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid wurden die Reaktionsbedingungen: 1. Molverhältnis 1 : 1 (19,2 g; 0,03 Mol Zuckerkomponente und 6,3 g; 0,03 Mol Esterkomponente), 2. Reaktionsdauer 7 Tage, 3. Lösen der Zuckerkomponente in 500 ml Acetonitril und der Esterkomponente in 100 ml Acetonitril und 4. Zugabe der Esterkomponente zu der Zuckerkomponente in der Kälte eingehalten. Es wurden für sämtliche Ansätze, außer Ansatz 2, nur eine Fraktion erhalten, die in Essigester lösliche Fraktion. Dabei erwiesen sich die Analysenergebnisse der Ansätze 1, 3 und 2, Fraktion II, mit den berechneten Werten des oben erwünschten Nucleosid-Analogen als gut übereinstimmend. Ansatz 2, Fraktion I, zeigt eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten für das

Tabelle 28: Umsetzungsprodukt des Nicotinyltyrosinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf Nicotinyltyrosinäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{17}H_{19}ClN_2O_4$; Molgewicht: 350,812; C ber. 58,20 %; H ber. 5,46 %; N ber. 7,98 %; Cl ber. 7,99 %

Ansatz	Fraktion	Acetyltribenzoylribofuranose		Acetonitril	Nicotinyltyrosinäthylester		Acetonitril	Rk.-Zeit	Ausbeute		Schmp.	Analyse		
Nr.		g	Mol	ml	g	Mol	ml	Tage	g	%	°C	C gef.	H gef.	N gef.
1	I	15,2	0,03	250	9,4	0,03	450	7	8,6	81,98	97-101	54,68	5,36	5,33
2	I	15,2	0,03	250	9,4	0,03	450	14	14,6	-	98-100	58,27	5,12	4,89

Tabelle 29: Umsetzungsprodukt des Nicotinylglycinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.4.6-tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranose

Analysenwerte bezogen auf N^1-[2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$, $C_{44}H_{39}ClN_2O_{12} \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 841,29; C ber. 62,82 %; H ber. 4,91 %; N ber. 3,33 %; Cl ber. 4,20 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyltetrabenzoylglucopyranose g	Acetyltetrabenzoylglucopyranose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylglycinäthylester g	Nicotinylglycinäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.
1	I	19,2	0,03	500	6,3	0,03	100	7	2,2	8,80	105-113	63,0	4,9	3,8
2	II	19,2	0,03	500	6,3	0,03	100	7	4,0	16,06	93-103	64,7	4,9	-
3	I	19,2	0,03	500	6,3	0,03	100	7	2,0	8,03	105-115	63,1	5,1	3,2
		Analysenwerte bezogen auf Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$; Molgewicht: 244,687; C ber. 49,09 %; H ber. 5,36 %; N ber. 11,45 %; Cl ber. 14,49 %												
2	I	19,2	0,03	500	6,3	0,03	100	7	2,0	27,02	165-178	49,2	5,1	10,9

Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid. Die Vorschrift für den Ansatz 3 wird als gültige Vorschrift verwendet. Die Werte sind in Tabelle 29 nachzulesen.

8.3.2.10. Umsetzung von 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose mit Nicotinylglycinäthylester.

Für die Untersuchung der Wirkung von fluorierten Verbindungen auf Insekten wurde versucht, das p-fluorbenzoylierte Nucleosid N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid darzustellen. Die vier variierbaren Reaktionsbedingungen blieben bei den Ansätzen 1 und 2 unverändert: 1. Das Molverhältnis der Komponenten betrug 1 : 1 (0,015 bzw. 0,03 Mol der Zukkerkomponente und 0,015 bzw. 0,03 Mol der Esterkomponente),2. die Reaktionsdauer betrug jedesmal 7 Tage, 3. die Esterkomponente wurde in 50 bzw. 100 ml Acetonitril gelöst und in der Kälte zur Zuckerkomponente, gelöst in 300 ml bzw. 600 ml Acetonitril, hinzugegeben, dabei wurde 4. die Reihenfolge der Zugabe eingehalten.

Beide Versuchsansätze ergaben je 2 Fraktionen: I, die in Essigester unlösliche, die Produkte dieser Fraktionen ähneln nach den Analysenergebnissen denen des Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorids; und II, die Essigester lösliche, deren Produkte nach den Analysenergebnisse dem gewünschten Nucleosid sehr ähneln. Die Ausbeuten sind im Rahmen der anderen Verbindungen und in Tabelle 30 zu finden.

Tabelle 30: Umsetzungsprodukt des Nicotinylglycinäthylesters mit 1-O-Acetyl-2.3.5-tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranose

Analysenwerte bezogen auf N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid, $C_{36}H_{30}ClF_3N_2O_{10} \cdot 1H_2O$; Molgewicht: 761,125; C ber. 56,81 %; H ber. 4,24 %; N ber. 3,68 %; F ber. 7,49 %; Cl ber. 4,66 %

Ansatz Nr.	Fraktion	Acetyltrifluorbenzoylribose g	Acetyltrifluorbenzoylribose Mol	Acetonitril ml	Nicotinylglycinäthylester g	Nicotinylglycinäthylester Mol	Acetonitril ml	Rk.-Zeit Tage	Ausbeute g	Ausbeute %	Schmp. °C	Analyse C gef.	Analyse H gef.	Analyse N gef.	Analyse F gef.
1	II	8,38	0,015	300	3,15	0,015	50	7	2,0	17,5	92-93	57,14	4,18	4,16	10,84
2	II	16,76	0,03	600	6,30	0,03	100	7	4,9	21,5	89-91	57,21	4,18	4,04	6,63
		Analysenwerte bezogen auf das Nicotinylglycinäthylester-N^1-hydrochlorid, $C_{10}H_{13}ClN_2O_3$; Molgewicht: 244,687; C ber. 49,09 %; H ber. 5,36 %; N ber. 11,45 %; Cl ber. 14,49 %													
1	I	8,38	0,015	300	3,15	0,015	50	7	0,5	13,6	171-172	49,98	5,12	10,59	-
2	I	16,76	0,03	600	6,30	0,03	100	7	1,5	20,4	168-169	51,01	5,01	10,04	-

8.4. Versuche zur Darstellung weiterer Synthesestufen in Richtung eines NAD-Analogen

Analog der Darstellung des NAD bzw. des NMN wurde versucht, auch die NAD-Analoge darzustellen, als erstes das NAD-Glycin-Analoge.

Dabei wurde nach der Synthese der benzoylierten Vorstufe die Benzoylgruppen mittels NH_3 abgespalten und anschließend versucht, nach zwei Vorschriften

1.) von N. H. Hughes, L.J. Haynes, G.W. Kenner, A. Todd (35)

2.) nach Ch. Woenckhaus, R. Kaleja und P. Heik (102.) zu arbeiten.

8.4.1. Versuche zur Debenzoylierung von N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid zu N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (LXXVII).

Vorversuch: Ansatz 1

5,0 g N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid werden in 500 ml bei 0^oC mit NH_3 gesättigtem Methanol gelöst und etwa 18 Stdn. darin stehen gelassen. Die Lösung wird dann im Vakuum eingedampft. Der gelbe, sirupöse Rückstand wird dann in 10 ml Methanol gelöst und zu 1 l trockenem, eiskalten Essigsäure~~di~~äthylester hinzugetropft. Dabei fällt ein gelber, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt und zum Umfällen in wenig Methanol gelöst wird. Die Ausfällung geschieht wiederum durch Eintropfen in 1 l kalten Essigester. Das Produkt wird nach Absaugen im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 1,0 g Abspaltungsprodukt

Schmelzpunkt: 55 - 60°C

Bezogen auf das N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$

Bruttoformel:	$C_{15}H_{22}ClN_2O_7 \cdot 1H_2O$	C (gefunden)	42,20 %
		(berechnet)	45,55 %
		H (gefunden)	5,70 %
		(berechnet)	6,11 %
		N (gefunden)	12,30 %
		(berechnet)	7,07 %

Molgewicht : 395,84

Gültige Vorschrift: Ansatz 2

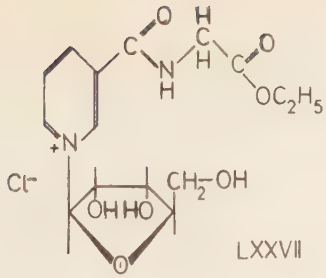
10,0 g N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid werden in 1 l bei 0°C mit NH_3 gesättigtem Methanol gelöst und 3 Stdn. bei 5°C im Kühlschrank stehen gelassen. Die Lösung wird dann bei Zimmertemperatur im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 20 ml Methanol gelöst. Die Methanollösung wird dann zu 2 l trockenem, eiskalten Essigsäureäthylester getropft. Dabei fällt ein hellgelber, flockiger Niederschlag aus, der abgesaugt und zum Umfällen in wenig Methanol gelöst wird. Die Ausfällung geschieht wiederum durch Eintropfen in kalten Essigester. Das Produkt wird nach Absaugen im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 3,0 g Abspaltungsprodukt N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid $\cdot 1H_2O$

Schmelzpunkt: 40 - 42°C

Bruttoformel:	$C_{15}H_{22}ClN_2O_7 \cdot 1H_2O$	C (gefunden)	43,88 %
		(berechnet)	45,53%
		H (gefunden)	5,78 %
		(berechnet)	6,11 %
		N (gefunden)	9,71 %
		(berechnet)	7,07%

Molgewicht : 395,84



LXXVII

8.4.2. Versuch der Rebenzoylierung des N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorids · $1H_2O$ zu N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid · $1H_2O$

1,88 g (0,005 Mol) N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid werden in 25 ml Methanol gelöst, zu denen noch 10 ml Methanol mit etwas HCl gelöst kommen. Es wird 90 Min. bei Zimmertemperatur gerührt. Dann kommen 3 ml Pyridin hinzu und anschließend wird bei Zimmertemperatur im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird nun in 17,5 ml Pyridin gelöst, die Lösung auf dem Eis-NaCl-Bad gekühlt und mit 2,5 ml Benzoylchlorid unter starkem Schütteln versetzt. Die Reaktionsmischung bleibt 2 Tage im Kühlschrank stehen, wird dann in 40 ml Wasser eingegossen, geschüttelt, und die Phasen werden getrennt. Die wäßrige Phase wird 3 mal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroform-Pyridin-Lösungen werden dann 3 mal mit je 20 ml $NaHCO_3$-Lösung, 3 mal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Dann wird im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wird 3 mal mit je 10 - 15 ml Toluol gelöst, das abdestilliert wird. Anschließend wird der Rückstand in 20 ml Chloroform gelöst und in 100 ml eiskalten Äther eingegossen. Der graue Niederschlag wird abgesaugt, getrocknet und in 15 ml Essigester gelöst. Diese Lösung wird wiederum in 100 ml kalten Äther eingegossen. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Äther gewaschen und anschließend im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

Ausbeute : 1,0 g rebenzoyliertes Produkt

Bezogen auf das N^1-[2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester·$1H_2O$

Schmelzpunkt: 101 - 104°C

Bruttoformel: $C_{36}H_{33}N_2O_{10}\cdot 1H_2O$

C	(gefunden)	65,28 %
	(berechnet)	64,37 %
H	(gefunden)	4,10 %
	(berechnet)	5,26 %
N	(gefunden)	4,83 %
	(berechnet)	4,17 %
Cl	(gefunden)	0,36 %
	(berechnet)	

Molgewicht : 671,70

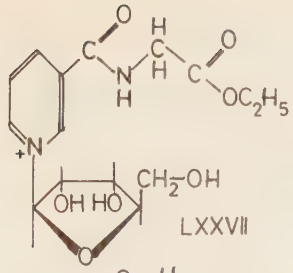
8.4.3 Versuche zur Phosphorylierung

8.4.3.1. Versuch zur Phosphorylierung des Reaktionsprodukts analog der Vorschrift von N.A. Hughes, L.J. Haynes, G.W. Kenner und A. Todd (35.)

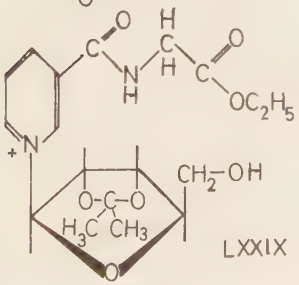
Vorschrift:

3,8 g N^1-[ß-D-Ribofuranosyl]-nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid werden in 200 ml Nitromethan durch 12-stündiges Schütteln suspendiert. Danach kommen zur Suspension 0,5 ml H_2O und 3,5 ml frisch destilliertes $POCl_3$ hinzu. Die Mischung wird dann mehrere Tage geschüttelt, danach die abfiltrierte Lösung auf 30 ml eingeengt und mit 500 ml Eiswasser versetzt. Der pH-Wert wird danach mit 10%iger NH_3-Lösung auf 5 eingestellt. Anschließend wird diese durch eine Dowex-2-Anionenaustauscher-Kolonne geschickt. Die Kolonne wird anschließend mit 0,001 n Essigsäure eluiert. Die Filtrate und Waschwässer werden auf 250 ml konzentriert und danach durch eine Dowex-50-Kationenaustauscher-Kolonne geschickt. Die Gesamtlösung, die auf 20 ml eingeengt ist, wird anschließend gefriergetrocknet.

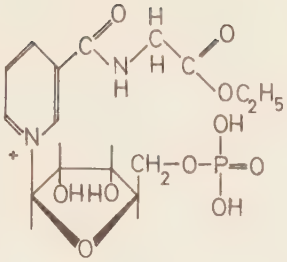
Es gab kein Endprodukt, das analytisch mit dem erwünschten Produkt übereinstimmte.



LXXVII



LXXIX



LXXVIII

8.4.3.2. Versuch der Phosphorylierung des Umsetzungsprodukts analog der Vorschrift von Ch. Woenckhaus, R. Kaleja und P. Haik (102.)

Da der erste Versuch zur Phosphorylierung des benzoylierten Nucleosids nicht gelang, wurde nach einer Vorschrift von Ch. Woenckhaus und Mitarbeitern versucht, das NMN darzustellen.

Der Reaktionsweg geht zunächst über die Darstellung des N^1- [Isopropoliden-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorids (LXXIX).

Vorschrift:

3,8 g (0,01 Mol) N^1- [Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid werden in 400 ml trockenem Aceton suspendiert und mit 20 g p-Toluolsulfonsäure-monohydrat versetzt. Nach 3-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die Lösung in 1 l Eiswasser gegeben, das mit 50 ml 28%igem wäßrigen NH_4OH versetzt war. Die erhaltene Lösung wird dann im Vakuum bei 35°C zur Trockene eingedampft, der Rückstand dann mit warmem Aceton extrahiert und anschließend im Vaku-

um eingedampft. Die sirupöse Verbindung kristallisiert nicht und wird sofort weiterverarbeitet.

3,0 g des N^1- [Isopropyliden-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorids werden in 40 ml Pyridin gelöst und mit 32 ml ß-Cyanäthylphosphat-Lösung (aus 10,24 g Ba-ß-Cyanäthylphosphat) versetzt. Das Gemisch wird dann bei 30°C im Vakuum zur Trockne eingeengt und Reste der Feuchtigkeit durch wiederholtes Abdampfen mit je 50 ml Pyridin entfernt. Anschließend wird der Rückstand in 108 ml Pyridin gelöst und die Lösung mit 15,2 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur werden 150 ml Wasser hinzugesetzt und das Lösungsmittel im Vakuum bei 50°C entfernt. Zum Rückstand gibt man 500 ml 0,4 n LiOH-Lösung und läßt das Gemisch 4 Stdn. bei Zimmertemperatur stehen. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffes wird die Lösung neutralisiert und auf eine Dowex-50 x 8 - Ionenaustauschersäule (200 - 400 mesh; H-Form) gegeben. Das Reaktionsprodukt wird mit Wasser eluiert. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und bei ca. 30°C im Vakuum auf 5 ml eingedampft. Mit Aceton fällt ein brauner Niederschlag aus, der kein Analysenergebnis gab.

9. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die chemische Synthese

1. der Nicotinylaminosäureester:

   Nicotinylglycin- (Nic.gly.est.), -alanin- (Nic.ala.est.), -methionin- (Nic.met.est.), -S-benzyl-L-cystein- (Nic. S-bzl.cys.est.), -tyrosin- (Nic.tyr.est.), -tryptophan- (Nic.tryp.est.), -glutaminsäurediäthylester (Nic.glu.est.) und Di- [Nicotinyl] -lysinäthylester (Di-Nic.lys.est.),

2. der Ribosyl-Derivate bzw. benzoylierten Nucleosid-Derivate:

   N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycin- (Nic.gly.rib.), -nicotinylalanin- (Nic.ala.rib.), -nicotinylmethionin- (Nic.met.rib.), -nicotinyl-S-benzyl-L-cystein- (Nic.S-bzl.cys.rib.), -nicotinyltyrosin- (Nic.tyr.rib.), -nicotinyltryptophanäthylester-N^1-chlorid (Nic.tryp.rib.), -nicotinylglutaminsäurediäthylester-N^1-chlorid (Nic.glu.rib.), Di- {N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-benzoyl-ß-D-ribofuranosyl] nicotinyl} -lysinäthylester-N^1-chlorid (Di-Nic.lys.rib.), N^1- [2'.3'.5'-Tri-O-p-fluorbenzoyl-ß-D-ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.pF-rib.) und N^1- [2'.3'.4'.6'-Tetra-O-benzoyl-ß-D-glucopyranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Nic.gly.gluc.) und des debenzoylierten Nucleosid-Derivats: N^1- [ß-D-Ribofuranosyl] -nicotinylglycinäthylester-N^1-chlorid (Deb.Nic.gly.rib.) beschrieben.

3. Es wird ein Weg zur enzymatischen Synthese des Nicotinylglycinäthylester-Adenin-Dinucleotids (NGÄEAD) gezeigt.

4. Die erzeugten Verbindungen werden auf ihre Wirksamkeit an Insekten geprüft.

Nach den einleitenden Kapiteln umfaßt der experimentelle Teil eine Darstellung der Synthesewege, die Konstitutionsaufklärung, die Beschreibung der hergestellten Produkte und die Wiedergabe der gültigen Vorschriften zur Synthese der oben angeführten Verbindungen, ferner die Prüfung auf Stoffwechselwirksamkeit an Insekten und die Versuche zur enzyma-

tischen Darstellung eines NAD-Analogen.

In dem Teil über die Darstellung der Synthesewege werden besonders die Reaktionsbedingungen der Versuchsansätze behandelt. Der Teil über die Konstitutionsbestimmung wird vorgezogen. Diese Untersuchungen beziehen sich auf die Elementaranalyse, auf einfache qualitativ- und quantitativ-analytische Untersuchungsmethoden und auf spezielle, wie Infrarotspektroskopie und Dünnschichtchromatographie. Die Ergebnisse der Elementaranalyse der Verbindungen werden tabellarisch wiedergegeben.

Die qualitativ-analytischen Untersuchungen erstrecken sich auf den Kohlenhydrat-Teil der benzoylierten Nucleoside (Molisch-, Tollins- und Seliwanow-Probe) und auf die Anwesenheit von Chlor-Ionen. Die quantitativ-analytischen Untersuchungen erfassen die durch Hydrolyse abgespaltenen funktionellen Gruppen und den Chlorgehalt (Methode nach Fajans). Die Infrarotspektroskopie und die Dünnschichtchromatographie dienen der Stützung des Konstitutionsbeweises. Die Spektralaufzeichnungen werden verglichen und diskutiert. Die R_f-Werte der Dünnschichtchromatogramme, die nach der Hydrolyse der Verbindungen hergestellt wurden, werden tabellarisch wiedergegeben und kurz erläutert.

Es wird eine Beschreibung der synthetisierten Produkte, der physikalischen Eigenschaften und eine Zusammenfassung der analytischen Ergebnisse für die einzelnen Verbindungen gegeben. Dem folgt eine Zusammenstellung der gültigen Vorschriften zur Darstellung der Nicotinylaminosäureester und der definiert reinen und verunreinigten benzoylierten Nucleosid-Derivate und tabellarische Wiedergabe der Verbindungen.

Die Prüfung der Produkte auf Stoffwechselwirkung erfolgte an Taufliegen (Drosophila melanogaster) nach 2 Methoden, die kurz erläutert, deren Ergebnisse diskutiert und tabellarisch wiedergegeben werden.

Der Versuch zur Darstellung eines NAD-Analogen erfolgte mittels einer aus Schweinehirn nach bekannten Vorschriften gewonnenen NAD-Glykohydrolase, dessen Aktivität und Konzen-

tration bestimmt wurde, durch Transferenz-Wirkung auf das NAD.

Im speziellen experimentellen Teil werden die gesamten Vorschriften zur Synthese der Ausgangsverbindungen, der Nicotinylaminosäureester und der benzoylierten Nucleosid-Derivate (Vorschriften der Vorversuchsansätze und der gültigen Vorschriften) wiedergegeben und in einem besonderen Kapitel unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen der einzelnen Ansätze diskutiert. Am Schluß der Arbeit werden noch Vorschriften über Debenzoylierung und Phosphorylierung des Nic.gly.rib. in Richtung der Synthese eines NAD-Analogen gegeben. Eine Vorschrift zur Rebenzoylierung des Deb.Nic.gly.rib. als Beweis der Abspaltbarkeit der Benzoylgruppen wird angeführt.

10. Literaturverzeichnis

1. Alivisatos, S.G.A.; D.W. Woolley: J. Am. Chem. Soc. 77. 1065 (1955)
2. Alivisatos, S.G.A.; F. Ungar, L. Luckas, L. La Mantia: J. Biol. Chem. 235. 1742 (1960)
3. Alivisatos, S.G.A.; L. La Mantia: Biochem. Biophys. Res. Commun. 2. 164. (1960)
4. Anderson, B.M.; N.O. Kaplan, C.J. Ciotti: J. Biol. Chem. 234. 1219 (1959)
5. Anderson, B.M.; N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 234. 1226 (1959)
6. Atkinson, M.A.; J.F. Jackson, R.K. Morton, A.W. Murray: Nature 196. 35 (1962)
7. Borkovec, A.B.; Int. Congr. Entomol., 2 nd;Bd. 2 469
8. Brunnemann, A.; H. Coper: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exptl. Path. Pharmak. 248. 514 (1964)
9. Bücher, Th.; M. Klingenberg: Angew. Chem. 70. 552 (1958)
10. Burton, R.M.; N.O. Kaplan: Arch. Biochem. Biophys. 70. 107 (1957)
11. Burton, R.M.; A. San Pietro, N.O. Kaplan: Arch. Biochem. Biophys. 70. 87. (1957)
12. Ciotti, M.M.; S.R. Humphreys, J.M. Vendetti, N.O. Kaplan, A. Goldin: Cancer Res. 20. 1195 (1960)
13. Colowick, S.P.; N.O.Kaplan, M.M. Ciotti: J. Biol. Chem. 191. 447 (1951)
14. Coper, H.: Biochem. J. 106, 7 P (1968)
15. Davoll, J.; B. Lythgoe, A.R. Todd: J. Chem. Soc. (London) 967. (1948)
16. Dietrich, L.S.; J.M. Friedland, L.A. Kaplan: J. Biol. Chem. 233. 964 (1958)
17. Domenjoz, R.; Arch. int. Pharmacodyn. 78. 128 (1946)
18. Doxy, D.; A. Rhodes: Ann. Botany 15. 47 (1951)
19. Du Vigneaud, Andrieth, Lornig: J. Am. Chem. Soc. 52. 4500 (1930)

20. Enders, A.; H. Ruf: Arch. int. Pharmacodyn. 90. 175 (1952)

21. Euler, H. von; H. Heiwinkel, F. Schlenk: Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem. 247 (1937)

22. Eys, J. van; A. San Pietro, S.P. Colowick: Science 127. 1443 (1958)

23. Eys, J. van; J. Biol. Chem. 233. 1203 (1958)

24. Eys, J. van; N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 228. 305 (1957)

25. Eys, J. van; M.M. Ciotti, N.O.Kaplan: J. Biol. Chem. 231. 571 (1958)

26. Fawcett, C.P.; N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 237. 1709 (1962)

27. Florkin, M.; E.H. Stotz: Comprehensive Biochemistry 14. 40 - 44.

28. Gadallah, A.J.; W.W. Kilgore, R.R. Painter: J. Econ. Entomol. 63. 1777 (1970)

29. Gadallah, A.J.; W.W. Kilgore, R.R. Painter: J. Econ. Entomol. 65. 36 (1972)

30. Gavaudan, P.; H. Poussel: C.R. hebd. Séances Acad. Sci. 224. 683 (1947)

31. Handler, P.; J.R. Klein: J. Biol. Chem. 143. 49 (1942)

32. Harington, Rivers: Biochem. J. 38. 417 (1944)

33. Haynes, L.J.; N.A. Hughes, G.W. Kenner, A. Todd: J. Chem. Soc. (London) 3733 (1957)

34. Hofmann, E.; H. Gütherberg: Acta Biol. Med. Germ. 7. 126 (1961)

35. Hughes, N.A.; L.J. Haynes, G.W. Kenner: J. Chem. Soc. (London) 3727 (1957)

36. Jakobson, K.B.; N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 226. 427 (1957)

37. Kaplan, N.O.; S.P. Colowick, A. Nason: J. Biol. Chem. 191. 473 (1957)

38. Kaplan, N.O.; M.M. Ciotti: J. Biol. Chem. 221. 823 (1956)

39. Kaplan, N.O.; M.M. Ciotti, F.E. Stolzenbach: J. Biol. Chem. 221. 833 (1956)

40. Kaplan, N.O.; M.M. Ciotti: Ann. N. Y. Acad. Sci. 94. 701 (1961)
41. Kaplan, N.O.; S.P. Colowick, M.M. Ciotti: J. Biol. Chem. 194. 579 (1952)
42. Kaplan, N.O.; L.J. Zatman, S.P. Colowick: J. Biol. Chem. 200. 197 (1953)
43. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 8. Aufl. S. 83
44. Kearns, C.W.; L. Ingle, R.L. Metcalf: J. Econ. Entomol. 38. 661 (1945)
45. Kilgore, W.W.; R.R. Painter: J. Econ. Entomol. 55. 710 (1962)
46. Kissman, H.M.; Ch. Piddacks: J. Am. Chem. Soc. 77. 18 (1955)
47. Klenow, H.; B. Anderson: Biochim. Biophys. Acta 23. 92 (1957)
48. Kornberg, A.; O. Lindberg: J. Biol. Chem. 176. 665 (1948)
49. Kosower, E.M.; Biochim. Biophys. Acta 56. 474 (1962)
50. Lamborg, M.R.; F.E. Stolzenbach, N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 231. 685 (1958)
51. Läuger, P.; W. Voegtli: Helv. chim. Acta 38. 46 (1955)
52. Läuger, P.; H. Martin, P. Müller: Helv. chim. Acta 27. 892 (1944)
53. Leighton, S.B.; Thesis, John-Hopkins Univ. Baltimore 1957
54. Lowry, O.H.; N.J. Rosenbrogh, A.L. Farr, R.J. Randall: J. Biol. Chem. 193. 265 (1951)
55. Lüdtke, H.; H. Hopp: Naturw. 40. 346 (1953)
56. Mann, P.J.G.; J.H. Quastel: Biochem. J. 35. 502 (1941)
57. Martin, H.; R.L. Wain: Nature (London) 154. 512 (1944)
58. Matsumura, F.; R.D.O. Brien: J. Agr. Food Chem. 14. 36 (1966)
59. Mc Ilwain, H.; R. Rodnight: Biochem. J. 44. 337 (1949)

60. Michelson, A.M.: The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides S. 39. (1963)

61. Pehlmann, H.: Diplomarbeit:" Synthese von halogenierten Pyrimidin-Derivaten. "

62. Perkow, W.: Die Insektizide, 2. Aufl., S. 35 - 37.

63. Petersen, K.F.; H. Kröger, H.W. Rotthauve: Z. f. Hygiene 147. 350 (1961)

64. Pfleiderer, G.; T.T. Holbrock, T. Wieland: Biochem. Z. 338. 52. (1963)

65. Pfleiderer, G.; E. Holmholz-Merz, D. Gerlach: Biochem. Z. 336. 371 (1962)

66. Pfleiderer, G.; E. Sann, F. Ortanderl: Biochim. Biophys. Acta 73. 39 (1963)

67. Pfleiderer, G.; E. Sann, A. Stock: Chem. Ber. 93. 3083 (1960)

68. Pfleiderer, G.; Ch. Woenckhaus: Angew. Chem. 75. 92 (1963)

69. Pistor, K.: Z. angew. Zoolog. 45. 351 (1958)

70. Preiss, J.; P. Handler: J. Biol. Chem. 233. 488 (1958)

71. Preiss, J.; P. Handler: J. Biol. Chem. 233. 493 (1958)

72. Pullman, M.E.; A. San Pietro, S.P. Colowick: J. Biol. Chem. 206. 129 (1954)

73. Rapoport, S.M.; Medizinische Biochemie, 5 Aufl., S. 375 - 396

74. Riemschneider, R.; H. Pehlmann: Z. f. Naturf. 20 b. 540 (1965)

75. Riemschneider, R.; M. Ruiz, M.C. da Rocha: unveröffentlichte Arbeiten

76a. Riemschneider, R.; Die Pharmazie, 9. Beiheft, 1. Ergänzungsband (1950)

76b. Riemschneider, R.: Advances of Pest Control Research 2. S. 370 (1958)

77. Ruske, W.: Einführung in die organische Chemie S. 363

78. Schlenk, F.; H. Hellström, H. von Euler: Ber. 71. 1471 (1938)

79. Schrader, G.: Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäureester, 3. Aufl. (1963)
80. Shuster, L.; N.O.Kaplan: J. Biol. Chem. 215. 195 (1955)
81. Siegel, J.M.; G.A. Montgomery, R.M. Bock: Arch. Biochem. Biophys. 82. 288 (1959)
82. Skerret, J.E.; D. Woodcock: J. Chem. Soc. (London) 3308 (1952)
83. Späth, E.; H. Spitzer: Ber. 59. 1477 (1926)
84. Stathakos, D.; K. Wallenfels: Biochem. Z. 346. 89 (1966)
85. Sternburg, J.; C.W. Kearns, W.N. Brice: J. Econ. Entomol. 43. 214. (1950)
86. Tener, G.M.: J.Am.Chem. Soc. 83. 3060 (1961)
87. Ullmann : Enzyklopädie der techn. Chem. 15.130
88. Wallenfels, K.; H. Sund: Biochem. Z. 329. 41 (1957)
89. Wallenfels, K.; M. Gellrich, F. Kubowitz: Ann. Chem. 621. 137 (1959)
90. Wallenfels, K.; H. Dickmann: Hoppe-Seyler / Tierfelder: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-chem. Analyse Bd. VI/B S. 126 (10. Aufl.)
91. Walter, P.; N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 238. 2823 (1963)
92. Winer, A.D.; G.W. Schwert: J. Biol. Chem. 234. 1155 (1955)
93. Windmüller, H.G.; N.O. Kaplan: J. Biol. Chem. 236. 2716 (1961)
94. Windmüller, H.G.; N.O. Kaplan: Biochem. Biophys. Acta 56. 388 (1962)
95. Wirth, W.: Dtsch. med. Wschr. 79. 1205 (1954)
96. Woenckhaus, Ch.; P. Zumpe: Z. f. Naturforschung 23. b. 484 (1965)
97. Woenckhaus, Ch.; G. Pfleiderer: Biochem. Z. 341. 495 (1965)
98. Woenckhaus, Ch.; G. Pfleiderer: J. Liebig's Ann. Chem. 675. 205 (1964)
99. Woenckhaus, Ch.: Chem. Ber. 97. 2439 (1964)

100. Woenckhaus, Ch.; M. Volz, G. Pfleiderer: Z. f. Naturf. 19 b. 467 (1964)
101. Woenckhaus, Ch.; P.Zumpe: Biochem. Z. 343. 326 (1965)
102. Woenckhaus, Ch.; R. Kaleja, P. Haik: Z. f. Naturf. 23 b. 1252 (1970)
103. Wood; Du Vigneaud: J. Biol. Chem. 130. 109 (1939)
104. Yoshida, Akira: J. Biol. Chem. 240. 1118 (1956)
105. Zatman, L.J.; N.O. Kaplan, S.P. Colowick, M.M. Ciotti: J. Biol. Chem. 200. 197 (1953); 209. 453 (1954)
106. Zatman, L.J.; N.O. Kaplan, M.M. Ciotti: J. Am. Chem. Soc. 75. 3293 (1953)
107. Zatman, L.J.; S.P. Colowick, N.O. Kaplan, M.M. Ciotti: Bull. John-Hopkins-Hosp. 91. 211 (1952)

Nachtrag:

108. Knipling, E.F.: Principles of Insect Chemosterilization (1968)
109. Pillai, M.K.K.; K.K. Grover: Bull. Wld. Hth. Org. 40. 229 (1969); 41. 915 (1969)
110. Hediger, H.J.: Infrarotspektroskopie (1971)

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:		Harry Pehlmann, geb. 3.10.1931 in Berlin
Eltern	:	Johann Pehlmann, Lokomotivführer Margarete Pehlmann, geb. Reimann
Ehefrau	:	Barbara Pehlmann, geb. Johannsen, geb. 27.11.1936
Eheschließung	:	19.4.1963
Kinder	:	Uwe Pehlmann, geb. 10.9.1964 Anke Pehlmann, geb. 19.6.1967
1938 - 1951	:	Schulbesuch, Abitur an der Melanchthon Oberschule in Wittenberg
1951 - 1954	:	Chemiewerkerlehre im Stickstoffwerk Piesteritz bei Wittenberg und Tätigkeit als Chemiewerker
1954 - 1962	:	Studium der Chemie an der Freien Universität Berlin
1961 - 1962	:	Diplomarbeit bei Herrn Professor Dr. R. Riemschneider am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin; Diplom mit "gut"
1962 - 1970	:	Freier Mitarbeiter am Chemischen Zentralblatt; wissenschaftlicher Hilfsassistent am Institut für Biochemie
1970 bis heute	:	Wissenschaftlicher Assistent am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin

Meine akademischen Lehrer waren:

W. Broser, W. Franke, R. Frydrych, G. Fuchs, K.F. Jahr, H. Lassen, W. Lautsch, R. Lorenz, G. Manecke, K.R. Mehnert, K. Plieth, M. Richter, R. Riemschneider, P.W. Schenk, I. Stranski, K. Ueberreiter, K. Vetter.